

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

To:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE
in its capacity as elected Office

| | |
|---|--|
| Date of mailing: 11 January 2001 (11.01.01) | |
| International application No.: PCT/JP00/04362 | Applicant's or agent's file reference: JA433973 |
| International filing date: 30 June 2000 (30.06.00) | Priority date: 30 June 1999 (30.06.99) |
| Applicant: SATO, Haruya et al | |

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:
30 November 2000 (30.11.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

| | |
|---|---|
| The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35 | Authorized officer: J. Zahra Telephone No.: (41-22) 338.83.38 |
|---|---|

127
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

| | | |
|--|---|---|
| Applicant's or agent's file reference JA433973 | FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416) | |
| International application No. PCT/JP00/04362 | International filing date (day/month/year) 30 June 2000 (30.06.00) | Priority date (day/month/year) 30 June 1999 (30.06.99) |
| International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC G01N 33/15, 33/566, 33/50, A61K 47/48, 38/20, 38/21, 31/7028, C07H 15/04 | | |
| Applicant AJINOMOTO CO., INC. | | |

- This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
- This REPORT consists of a total of 3 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

 These annexes consist of a total of _____ sheets.

- This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

| | |
|---|---|
| Date of submission of the demand 30 November 2000 (30.11.00) | Date of completion of this report 26 January 2001 (26.01.2001) |
| Name and mailing address of the IPEA/JP | Authorized officer |
| Facsimile No. | Telephone No. |

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/04362

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/04362

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**1. Statement**

| | | | |
|-------------------------------|--------|------|-----|
| Novelty (N) | Claims | 1-33 | YES |
| | Claims | | NO |
| Inventive step (IS) | Claims | 1-33 | YES |
| | Claims | | NO |
| Industrial applicability (IA) | Claims | 1-33 | YES |
| | Claims | | NO |

2. Citations and explanations

The constituent feature that when a targeting DDS preparation is screened, the intensity of bond affinity is used as an indicator in addition to the capability to avoid the integration mediated by the bonding of a ligand to a receptor is neither described nor suggested in any of the documents cited in the ISR.

特 許 協 力 条 約

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
〔PCT36条及びPCT規則70〕

REC'D 09 FEB 2001

WIPO PCT

| | | |
|--|---|-------------------------|
| 出願人又は代理人 の書類記号 JA433973 | 今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/ IPEA/416）を参照すること。 | |
| 国際出願番号 PCT/JPO0/04362 | 国際出願日 (日.月.年) 30.06.00 | 優先日 (日.月.年) 30.06.99 |
| 国際特許分類 (IPC) Int. Cl ⁷ G01N33/15, G01N33/566, G01N33/50, A61K47/48, A61K38/20, A61K38/21, A61K31/7028, C07H15/04 | | |
| 出願人 (氏名又は名称) 味の素株式会社 | | |

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。

2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。

☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
- II ☐ 優先権
- III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV ☐ 発明の単一性の欠如
- V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ☐ ある種の引用文献
- VII ☐ 国際出願の不備
- VIII ☐ 国際出願に対する意見

| | | |
|--|---|----------|
| 国際予備審査の請求書を受理した日 30.11.00 | 国際予備審査報告を作成した日 26.01.01 | |
| 名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 | 特許庁審査官 (権限のある職員) 加々美 一恵 電話番号 03-3581-1101 内線 3250 | 2 J 9408 |

様式PCT/IPEA/409 (表紙) (1998年7月)



I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 _____ ページ/図、 出願時に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)



V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)

請求の範囲

1-33

有

請求の範囲

無

進歩性(IS)

請求の範囲

1-33

有

請求の範囲

無

産業上の利用可能性(IA)

請求の範囲

1-33

有

請求の範囲

無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

ターゲティング型DDS製剤をスクリーニングする際に、リガンドのレセプターへの結合を介した内在化回避能に加え、結合親和性の強さを指標にする点は、国際調査に引用したいずれの文献にも記載されておらず、示唆もされていない。



国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[PCT18条、PCT規則43、44]

| | | | |
|--------------------------|------------------|---|-------------------------|
| 出願人又は代理人 の書類記号 | JA433973 | 今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。 | |
| 国際出願番号 PCT/JPO0/04362 | 国際出願日 (日.月.年) | 30.06.00 | 優先日 (日.月.年) 30.06.99 |
| 出願人(氏名又は名称) 味の素株式会社 | | | |

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 2 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 1 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☐ なし

☒ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N33/15, G01N33/566, G01N33/50, A61K47/48, A61K38/20, A61K38/21, A61K31/7028, C07H15/04

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N33/15, G01N33/566, G01N33/50, A61K47/48, A61K38/20, A61K38/21, A61K31/7028, C07H15/04

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年

日本国公開実用新案公報 1971-2000年

日本国登録実用新案公報 1994-2000年

日本国実用新案登録公報 1996-2000年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA(STN), REGSTRY

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|------------------|
| A | Matsuda, M. <i>et al</i> , Interaction between the amino-terminal SH3 domain of CRK and its natural target proteins. Journal of Biological Chemistry, 1996, Vol. 271, No. 24 p14468-14472 | 1-33 |
| A | Bider, M. <i>et al</i> , High-affinity ligand binding to subunit H1 of the asialoglycoprotein receptor in the absence of subunit H2. European Journal of Biochemistry, 1995, Vol. 230, No. 1 p207-212 | 1-33 |

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16.08.00

国際調査報告の発送日

29.08.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

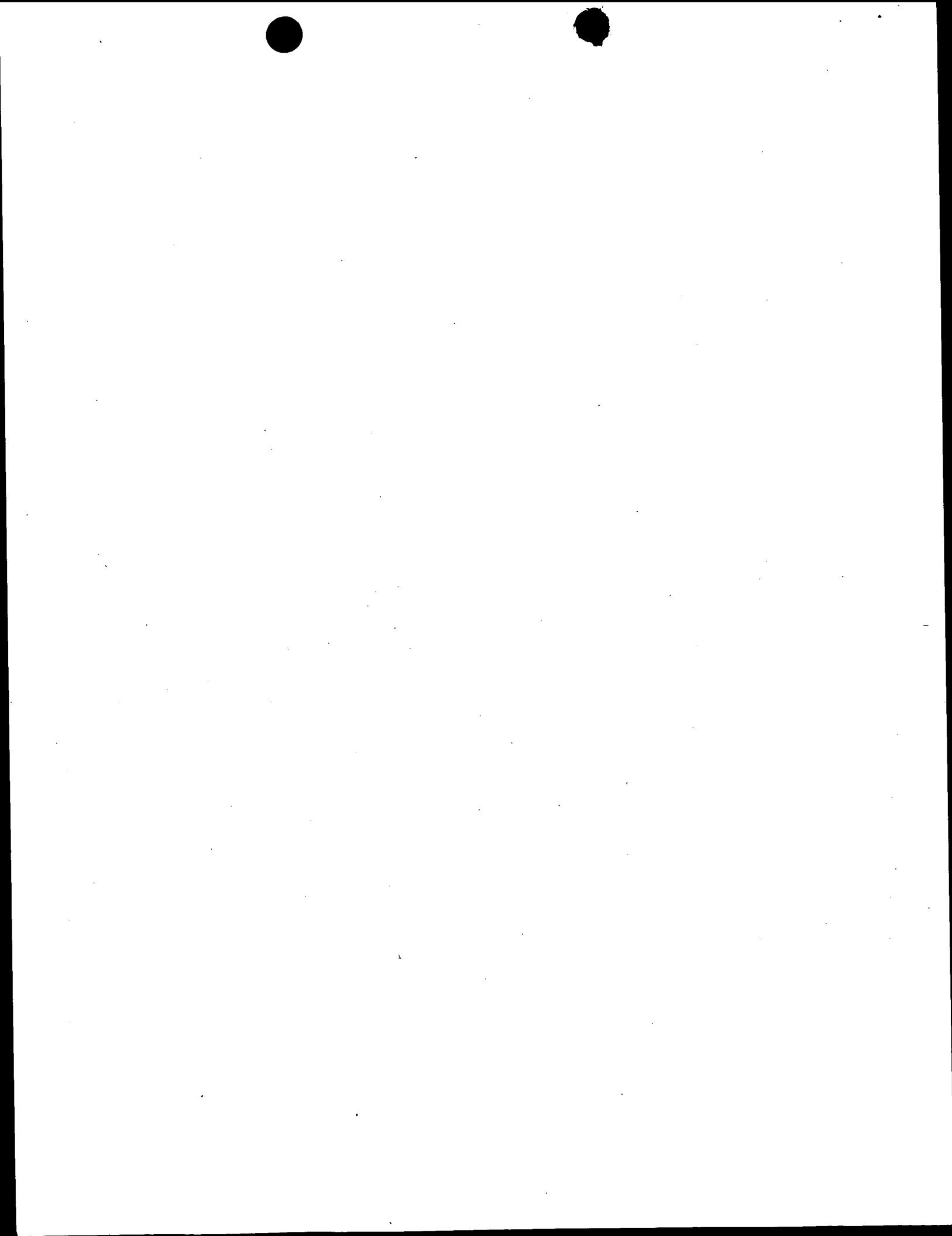
特許庁審査官 (権限のある職員)

加々美一恵

2J

9408

電話番号 03-3581-1101 内線 3252



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SAEKI, Norio
9th Floor, Taka-ai Building
15-2, Nihonbashi 3-chome
Chuo-ku, Tokyo 103-0027
JAPON

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

| | |
|--|---|
| Date of mailing (day/month/year) 07 November 2000 (07.11.00) | IMPORTANT NOTIFICATION |
| Applicant's or agent's file reference JA433973 | |
| International application No. PCT/JP00/04362 | International filing date (day/month/year) 30 June 2000 (30.06.00) |
| International publication date (day/month/year) Not yet published | Priority date (day/month/year) 30 June 1999 (30.06.99) |
| Applicant AJINOMOTO CO., INC. et al | |

- The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
- An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

| <u>Priority date</u> | <u>Priority application No.</u> | <u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u> | <u>Date of receipt of priority document</u> |
|-------------------------|---------------------------------|---|---|
| 30 June 1999 (30.06.99) | 11/186761 | JP | 18 Augu 2000 (18.08.00) |

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Somsak Thiphrakesone

Telephone No. (41-22) 338.83.38



訂正版

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2001年1月11日 (11.01.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/02851 A1(51) 国際特許分類: G01N 33/15, 33/566, 33/50, A61K
47/48, 38/20, 38/21, 31/7028, C07H 15/04

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/04362

(22) 国際出願日: 2000年6月30日 (30.06.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願平11/186761 1999年6月30日 (30.06.1999) JP(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 味の素株
式会社 (AJINOMOTO CO., INC.) [JP/JP]; 〒104-8315
東京都中央区京橋一丁目15番1号 Tokyo (JP).

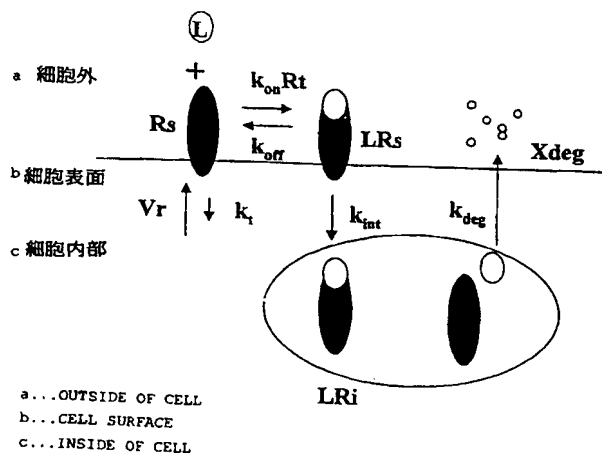
(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 佐藤晴哉 (SATO,
Haruya) [JP/JP]. 高原義之 (TAKAHARA, Yoshiyuki)
[JP/JP]. 林 永子 (HAYASHI, Eiko) [JP/JP]; 〒210-8681
神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社 中
央研究所内 Kanagawa (JP). 田畑智之 (TABATA, To-
moyuki) [JP/JP]. 鈴木 学 (SUZUKI, Manabu) [JP/JP].
田中泰弘 (TANAKA, Yasuhiro) [JP/JP]; 〒210-8681 神
奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社 医薬研
究所内 Kanagawa (JP). 杉山雄一 (SUGIYAMA, Yuichi)
[JP/JP]; 〒299-0232 千葉県袖ヶ浦市永地1437 Chiba
(JP). 加藤将夫 (KATO, Masao) [JP/JP]; 〒204-0012 東
京都清瀬市中清戸5-83-8 サンヒルズ101号 Tokyo (JP).(74) 代理人: 佐伯憲生 (SAEKI, Norio); 〒103-0027 東京都
中央区日本橋三丁目15番2号 高愛ビル9階 Tokyo (JP).

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR SCREENING TARGETING DDS PREPARATION

(54) 発明の名称: ターゲティング型DDS製剤のスクリーニング方法



(57) Abstract: A method for screening an optimized ligand, which can avoid the integration thereof in cell, with the guidance of a characteristic of the ligand of being capable of accumulating specifically in a target tissue by, after systemic administration, collecting the ligand around a specific receptor (ASGP-R, etc.) on the cell membrane due to the bond affinity to the receptor so as to minimize the integration mediated by the receptor; and tissue-targeting DDS preparations which can be accumulated and retained around a receptor by bonding an optimum ligand to a physiologically active protein via a covalent bond. Namely, a method for screening a ligand having a bond affinity to a protein such as a specific receptor or antigen present on the cell membrane of a target tissue or a substance modified with this ligand with the guidance of the ability to avoid the integration mediated by the bonding to the receptor, for example, the ratio of the constant of dissociation speed (K_{off}) to the constant of integration speed (K_{int}) to the receptor (i.e., K_{off}/K_{int}) and the strength of the bonding affinity; and medicinal preparations which can be accumulated and retained around a receptor, composed of the above-described ligand and a physiologically active protein or a low-molecular weight chemical bonded thereto

[続葉有]

WO 01/02851 A1



(81) 指定国 (国内): AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

(48) この訂正版の公開日: 2001 年 3 月 29 日

(15) 訂正情報:
PCTガゼット セクションIIの No.13/2001 (2001 年 3 月 29 日)を参照

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約:

本発明は、全身投与後、ASGP-Rなどの細胞膜上の特定なレセプターへの結合親和性によってその周辺に集積させ、レセプターを介した内在化をできるだけ回避することにより標的組織に特異的に蓄積し得るリガンドの特性を指標に、細胞内への内在化を回避できる最適化されたりガンドをスクリーニングする方法を提供する。さらに最適リガンドと生理活性蛋白質とを共有結合で結合させることにより、レセプター周辺への集積及び滞留を可能にする組織ターゲティング型DDS製剤を提供することにある。本発明は、標的組織の細胞膜上に存在する特定のレセプターあるいは抗原等の蛋白質に対する結合親和性を有するリガンド又は当該リガンドで修飾された物質を、当該レセプターへの結合を介した内在化回避能、例えば当該レセプターに対する解離速度定数 (k_{off}) と内在化速度定数 (k_{int}) との比 (k_{off}/k_{int})、及び結合親和性の強さとを指標としてスクリーニングする方法ならびにそのリガンドと生理活性蛋白質あるいは低分子薬物との結合体であるレセプター周辺への集積、滞留能を有する医薬品組成物に関する。

明 細 書

ターゲティング型DDS製剤のスクリーニング方法

技術分野

本発明は、細胞膜上の特定レセプター周辺への集積性及び滞留性を有するリガンドを、レセプターとの結合親和性及びレセプターを介した細胞内への内在化回避能を指標としてスクリーニングする方法、ならびにそのリガンドと生理活性蛋白質あるいは低分子薬物との結合体であるレセプター周辺への集積、滞留能を有する医薬品組成物に関する。

また、本発明は本発明のスクリーニング方法により、ターゲティング型DDS製剤を提供するものである。

背景技術

近年、遺伝子組換え技術を利用した生産により種々の生理活性蛋白質の医薬品開発が試みられてきたが、その実用化は非常に困難であった。生理活性蛋白質は微量で強い生理活性を示し、生理学的には標的部位で局所的に作用し、目的とした治療効果を奏した後は速やかに消失することが望まれていた。しかし、一般に投与された薬物は一部は目的とする作用部位に到達して治療効果を示すが、他の多くは他の組織にも分布し、代謝、排泄される。この過程で少なからず副作用を示すことになるが、標的部位に必要量到達させるためにはある程度以上の大量投与をしなければならなかった。さらに、(1) 生理活性蛋白質が生体内で酵素により分解され易く、血中滞留性が低い為に大量投与が必要であること、(2) 多様な生理活性をもち標的指向性が低いために、大量投与した場合、標的以外の臓器あるいは細胞周辺への分布により重篤な副作用が生じてくるなどの問題があった。

このような問題点を解決する最も有効な方法として、生理活性蛋白質による最適な治療効果を得る為に、薬物を目的とする作用の発現すべき部位に、必要な量、必要な時間、選択的に送り込みことを目的とした薬物投与形態、即ちドラッグデ

リバリーシステム（DDS、薬物送達システム）の重要性が強く認識されるようになった。この中で特に、薬物を標的部位に選択的に移行させるターゲティング（標的指向化）は、有効な薬物治療を行なう上での必須条件であった。薬物送達システム（DDS）により、生理活性蛋白質の体内動態を制御することにより標的臓器あるいは細胞へ集積させるターゲティング型DDS（T-DDS）が、生理活性蛋白質による治療において注目されてきている。

しかしながら、現時点におけるT-DDSの成功例は、インターロイキン-2レセプター（IL-2R）を発現しているT細胞皮膚リンパ腫選択的な攻撃が可能なIL-2-ジフテリア毒素融合蛋白質のみであり（米国において医薬品認可済。Nichols J, et al., Eur J Cancer, 33(1), 34-36 (1997)）、より応用性の高い臓器特異的なDDSは成功していなかった。

また、親油性抗がん剤SMANCS（合成高分子スチレンマレイン酸コポリマーと蛋白質系抗がん剤ネオカルチノスタチンとの結合体）／リピオドール（油系造影剤）の複合製剤の肝動脈内投与によって肝臓中の腫瘍組織に徐々に侵出し、肝臓癌を治療する方法も報告されている（Oncologia, 15: 9-104 (1995)）が、このような局所投与による特殊な方法ではなく、全身投与による頻回投与が可能で、幅広い肝疾患用薬物（特に蛋白質系）に応用可能な肝臓ターゲティング法の開発が望まれている。

特に、ウイルス性肝炎や肝硬変、肝癌などに対する肝疾患治療用生理活性蛋白質の肝臓ターゲティング型DDSの確立については種々の検討が行なわれたものの、元来肝臓が物質の代謝、分解等の機能を有している為、集積した蛋白質がすぐに分解されてしまい、肝局所で生理活性を発現させることは困難であった。

一方、本発明者らは、肝実質細胞特異的に発現しているアシアロ糖蛋白質レセプター（ASGPR）に対する結合親和性が、天然糖鎖型リガンド（アシアロオロソムコイド）に比べ低いリガンドを肝認識素子として利用することにより、肝集積後の生理活性蛋白質が細胞内への取り込みによる分解をある程度回避しうることを見出した。実際、蛋白質修飾酵素であるトランスグルタミナーゼを用いて調製したインターロイキン-2（IL-2）と合成低親和性リガンド（例えば、3分枝型ガラクトースリガンド（以下、（Gal）₃という。）との1対1ハイブ

リッド体は、肝集積性を示し、且つ肝実質細胞に取り込まれにくく、マウス肝癌モデルにおいて未修飾体に比べ強く腫瘍縮小させるとの知見を得、生理活性蛋白質の肝臓ターゲティングを可能にする、ASGP-Rに対する低親和性リガンド修飾生理活性蛋白質に関する特許を出願した(WO 98/13381)。

血漿糖蛋白質の肝への取り込みを担っているASGP-Rは、糖鎖末端の分枝したガラクトース(以下、Galという。)あるいはN-アセチルガラクトサミン(以下、GalNAcという。)を認識して結合した後、エンドサイトーシスにより細胞内へ糖蛋白質を取り込み、分解することが知られている(Ashwell G. and Harford J., Annu. Rev. Biochem., 75(3): 531-554(1982))。これまでGalを分枝させたりガンドの結合親和性をできるだけ高めることにより細胞内へ選択的に薬物を取り込ませる試みに関して多数報告されているが(Wu G. Y., et al., J. Biol. Chem., 263: 4429-4432(1987); Merwin J. R. et al., Bioconjugate Chem., 5: 612-620 (1994))、本発明者らのような低親和性リガンドを用いた例はまったく行なわれていなかった。

本発明者らのASGP-Rに対する低親和性リガンドを用いた修飾による生理活性蛋白質は、全身投与における生理活性蛋白質の肝臓集積と薬理作用発現を可能にした世界で初めての例であった。

しかしながら、本発明者らの低親和性リガンド修飾生理活性蛋白質、例えば、3分枝型ガラクトースリガンド修飾インターロイキン2(以下、(Gal)₃-IL-2という。)のマウス静脈内投与後の肝臓中及び血漿中の濃度の推移をELISAによって測定した結果を見てみると、時間経過と共にその濃度が低下することが判明した。(Gal)₃-IL-2の全身消失を決める臓器が主に肝臓であることを考えると、これらの結果は(Gal)₃による修飾によってもIL-2の肝臓における消失抑制効果が不十分であることを示している。即ち、ASGP-Rへの結合により肝臓へ集積した(Gal)₃-IL-2の一部は取り込みによる分解を回避するものの、一部は肝実質細胞内へエンドサイトーシスにより取り込まれ、分解されてしまっていると考えられる。

したがって、標的臓器のレセプターに対する親和性のみをパラメーターとした修飾ではターゲティング型DDSとしては不十分であり、ターゲティング型DD

Sとするためにはさらに改善する必要があることが判明した。特に、リガンドを標的としたDDSを完成させる為には、ASGPRのような細胞膜上の特定レセプターに対し内在化をできるだけ回避させる為の理論を構築し、その理論をもとにしたリガンドスクリーニング法を開発する必要があることがわかった。

発明の開示

本発明は、全身投与後、ASGPRなどの細胞膜上の特定なレセプターへの結合親和性によってその周辺に集積させ、レセプターを介した内在化をできるだけ回避することにより標的組織に特異的に蓄積し得るリガンドの特性を把握し、当該リガンド特性を指標に、細胞内への内在化を回避できるリガンドをスクリーニングする方法を開発し、最適化されたりガンドを見出すことにある。さらに最適リガンドと生理活性蛋白質とを共有結合で結合させることにより、蛋白質のレセプター周辺への集積及び滞留を可能にする組織ターゲティング型DDS製剤を提供することにある。

図面の簡単な説明

第1図は、細胞表面におけるリガンドとレセプターの速度論的モデルを示したものである。

第2図は、マウス肝細胞における $(Gal)_3-IL-2$ の細胞表面結合量(●印)、細胞内在量(□印)、分解生成物量(×印)及び細胞外量(△印)を時間(分)の経過と共に示したものである。

第3図は、マウス肝細胞における $(GalNAc)_3-IL-2$ の細胞表面結合量(●印)、細胞内在量(□印)、分解生成物量(×印)及び細胞外量(△印)を時間(分)の経過と共に示したものである。

第4図は、マウス初代培養肝細胞への $(Gal)_3-IL-2$ の取り込みの推移を示したものである。第4図中の、黒丸印(●)は細胞表面に結合したものを示し、黒四角印(■)は細胞に取り込まれて内在化したものを示し、白三角印(△)は分解生成物をそれぞれ示している。

第5図は、マウス初代培養肝細胞への $(GalNAc)_3-IL-2$ の取り込み

の推移を示したものである。第4図中の、黒丸印（●）は細胞表面に結合したものを示し、黒四角印（■）は細胞に取り込まれて内在化したものを示し、白三角印（△）は分解生成物をそれぞれ示している。

第6図は、マウス初代培養肝細胞へのIL-2の取り込みの推移を示したものである。第4図中の、黒丸印（●）は細胞表面に結合したものを示し、黒四角印（■）は細胞に取り込まれて内在化したものを示し、白三角印（△）は分解生成物をそれぞれ示している。

第7図は、生体内における薬物の速度論的モデルを示したものである。

第8図は、リガンド-IL-2ハイブリッド体の血漿中濃度のシュミレーションの結果を示したものである。第8図の、太い実線は（Gal）₃-IL-2を示し、細い実線は（GalNAc）₃-IL-2を示し、破線は未修飾IL-2をそれぞれ示している。

第9図は、リガンド-IL-2ハイブリッド体の肝細胞外液中濃度のシュミレーションの結果を示したものである。第9図の、太い実線は（Gal）₃-IL-2を示し、細い実線は（GalNAc）₃-IL-2を示し、破線は未修飾IL-2をそれぞれ示している。

第10図は、リガンド-IL-2ハイブリッド体のIL-2Rの占有率のシュミレーションの結果を示したものである。第10図の、太い実線は（Gal）₃-IL-2を示し、細い実線は（GalNAc）₃-IL-2を示し、破線は未修飾IL-2をそれぞれ示している。

第11図は、種々の k_{in} 及び k_{off} の値を有するリガンドを用いた場合の血漿中濃度の推移をシュミレーションした結果を示すものである。図の（A）は k_{in} の値が0.0896/minの場合、（B）は k_{in} の値が0.00896/minの場合、（C）は k_{in} の値が0.000896/minの場合を示している。

各図中の破線（各図中の1）は k_{off} の値が0.209の場合、点線（各図中の2）は k_{off} の値が2.09の場合、細点線（各図中の3）は k_{off} の値が20.9の場合、実線（各図中の4）は k_{off} の値が0.0209の場合、細破線（各図中の5）は k_{off} の値が0.00209の場合を示している。

第12図は、種々の k_{in} 及び k_{off} の値を有するリガンドを用いた場合の肝細

胞外液中濃度の推移をシュミレーションした結果を示すものである。図の (A) は k_{int} の値が $0.0896/min$ の場合、(B) は k_{int} の値が $0.00896/min$ の場合、(C) は k_{int} の値が $0.000896/min$ の場合を示している。

各図中の破線 (各図中の 1) は k_{off} の値が 0.209 の場合、点線 (各図中の 2) は k_{off} の値が 2.09 の場合、細点線 (各図中の 3) は k_{off} の値が 20.9 の場合、実線 (各図中の 4) は k_{off} の値が 0.0209 の場合、細破線 (各図中の 5) は k_{off} の値が 0.00209 の場合を示している。

第 13 図は、種々の k_{int} 及び k_{off} の値を有するリガンドを用いた場合の IL-2 レセプターの占有率の推移をシュミレーションした結果を示すものである。図の (A) は k_{int} の値が $0.0896/min$ の場合、(B) は k_{int} の値が $0.00896/min$ の場合、(C) は k_{int} の値が $0.000896/min$ の場合を示している。

各図中の破線 (各図中の 1) は k_{off} の値が 0.209 の場合、点線 (各図中の 2) は k_{off} の値が 2.09 の場合、細点線 (各図中の 3) は k_{off} の値が 20.9 の場合、実線 (各図中の 4) は k_{off} の値が 0.0209 の場合、細破線 (各図中の 5) は k_{off} の値が 0.00209 の場合を示している。

第 14 図は、(Gal)-IL-2 の各臓器における取り込みクリアランス (3 分の取り込み量 / 3 分までの AUC) と K_p 値 (3 分の取り込み量 / 3 分での血漿中濃度) を示したものである。

第 15 図は、(GalNAc)-IL-2 の各臓器における取り込みクリアランス (3 分の取り込み量 / 3 分までの AUC) と K_p 値 (3 分の取り込み量 / 3 分での血漿中濃度) を示したものである。

発明を実施するための最良の形態

本発明者らは、生理活性蛋白質などの薬物が標的組織において特異的に蓄積し得るためには、標的組織における特定のレセプターに対する結合親和性を有するリガンドが標的組織の細胞に内在化されるのを回避できる能力を有することとかつ適度な結合親和性の強さを有することという相反する条件 (内在化回避能が高

いと K_{off} の値が大きくなり、結合親和性が低くなることになる) がバランスされていることが重要であることを見出した。特に、生理活性蛋白質などの薬物が標的組織の細胞を直接標的とするものではなく標的細胞周辺の免疫細胞系の賦活化などにより病巣部の治療を目的とするものである場合あるいは標的レセプターへのターゲティングにより標的組織上の別のレセプターを介して生理作用を発揮させることを目的とする場合には、生理活性蛋白質などの薬物が標的組織の細胞に対する特異的な親和性は有しているが、当該細胞に急速に取り込まれないことが活性の持続に重要な要因であることを見出した。とりわけ、標的組織が化学物質の代謝を司る肝臓の場合には、肝実質細胞に薬物が急速に取り込まれると肝実質細胞により速やかに分解、代謝され、薬物の肝臓集積率を如何に高めても活性の持続時間は非常に短いということになる。

したがって、標的組織に対する親和性を単に高めるだけでは、標的組織に対する集積率は向上するものの、同時に標的組織の細胞による薬物の分解、代謝作用により薬物の不活性化も早くなり、その結果として投与された薬物の多くは目的の治療効果を発揮することができないこととなるので、薬物を大量に投与しないといけないということになる。

本発明者らは、このような知見に基づいて鋭意研究してきたところ、薬物の有効性を向上させるためには、標的組織に対する親和性のみならず、標的組織の細胞の周辺に効率よく滞留するための要因を加味することが重要であることを見出した。

一般に、特定のレセプターに対する結合親和性を有するリガンドは、当該レセプターに特異的に結合する。このことにより、リガンドを標的組織に特異的に集積させることが可能となるのであるが、標的組織の細胞のレセプターに特異的に結合したリガンドの大半は、その親和性故にレセプター介在型エンドサイトーシスあるいは非特異的なフリユイドフェイズ (fluid phase) エンドサイトーシス等により当該細胞に取り込まれることになり、その結果、標的組織の細胞の周辺に滞留する薬物の量は急速に減少することになる。しかし、レセプターに結合したリガンドが全て細胞内に取り込まれて内在化されるのではなく、一

部のリガンドはレセプターと解離して標的組織の細胞の周辺に再度滞留することになる。このように、標的組織の細胞表面のレセプターに結合したリガンドは、細胞に取り込まれて内在化されるか、レセプターと解離して再度細胞周辺に滞留することになるのであるが、これは細胞の特定のレセプターに対する親和性とは異なる要因に起因するものである。

本発明においては、レセプターに結合したリガンドが細胞に取り込まれる割合と、レセプターと解離して再度細胞周辺に滞留する割合の関係を「内在化回避能」という。この内在化回避能が大きなりガンドは、標的組織の細胞のレセプターと結合はするが、標的組織の細胞に取り込まれる割合が低く、このようなりガンドは長時間に亘って標的組織の細胞周辺を滞留することになり、標的組織における持続時間が長くなるということになる。当該レセプターに対する特異的な結合親和性を有するリガンドは、一般的には結合したリガンドの多くが細胞に取り込まれて内在化することになり、短時間で代謝されることになる。ところがリガンドによっては、レセプターに結合したリガンドが細胞内に取り込まれるよりも、解離し易いものがあり、このようなりガンドを生理活性蛋白質などの薬物に結合させることにより、標的組織に集積後、細胞外周辺に滞留しうると考えられた。ところで、解離しやすいリガンドとは、解離速度定数 k_{off} が大きいものを選択するという意味する。

一般に、リガンドのレセプターへの結合親和性の強さは

$$1/Kd = k_{on}/k_{off}$$

(ただし、 k_{on} は結合速度定数、 k_{off} は解離速度定数である。)

で表されるため、 k_{off} が大きくなると結合親和性は低くなり、標的組織への集積効率は低下する。本発明者らはこの「内在化回避能」と結合親和性の強さという相反する2つの条件をうまくバランスさせることにより、標的組織において持続時間の長いターゲティング型DDS製剤が得られること、及び、そのようなりガンドのスクリーニング方法を見出し、本発明するに至った。

したがって、本発明は、標的組織に対するターゲティング型DDS製剤をスクリーニングする方法において、標的組織の細胞膜上に存在する特定のレセプター

あるいは抗原等の蛋白質に対する結合親和性を有するリガンド又は当該リガンドで修飾された物質を、当該レセプターへの結合を介した内在化回避能と結合親和性の強さとを指標としてスクリーニングする方法に関するものであり、より詳細には特定のレセプターへの結合を介した内在化回避能が、当該レセプターに対する解離速度定数 (k_{off}) と内在化速度定数 (k_{int}) との比 (k_{off}/k_{int}) であり、その比 (k_{off}/k_{int}) が1以上であり結合親和性に関与する解離定数 (K_d) が10 mM以下であるリガンド又は当該リガンドで修飾された物質をスクリーニング方法に関する。

より詳細には、本発明のスクリーニング方法は、細胞膜上に存在する特定のレセプターあるいは抗原等の蛋白質（以下、レセプター等という。）に対する結合親和性を有するリガンド又はリガンドで修飾された物質を当該レセプターを発現する遊離細胞または培養細胞の存在下でインキュベートした後、細胞表面に結合しているリガンド又はリガンドで修飾された物質を洗浄した後、当該レセプター等に対する標識化されたりガンドを添加して細胞内への取り込みを抑えた低温下でインキュベートし、細胞表面への標識化リガンドの結合量が、当該親和性リガンドそのものの非標識体を初期に添加した場合の結合量に比べて高くなるリガンド又はリガンドで修飾された物質をスクリーニングする方法、又は、細胞膜上に存在する特定のレセプター等に対する結合親和性を有するリガンド又はリガンドで修飾された物質を、当該レセプター等が発現する遊離細胞又は培養細胞の存在下でインキュベートした後、細胞表面に結合しているリガンド又はリガンドで修飾された物質をキレート剤入りのバッファー又は酸性バッファーで洗浄した後、当該レセプター等に対する標識化された親和性リガンドを添加して細胞内への取り込みを抑えた低温下でインキュベートし、細胞表面への標識化されたりガンドの結合量が、レセプター等と結合後の解離速度定数と内在化速度定数の比が1以上であるリガンドを添加した場合の結合量に比べ高くなるリガンド又はリガンドで修飾された物質をスクリーニングする方法に関する。

さらに本発明は、前記した本発明のスクリーニング方法を行うことができる装置、それを行うための試薬キット、その方法でスクリーニングされたターゲティング型DDS製剤に適したりガンド、リガンドに適した化合物、並びに、その方

法でスクリーニングされたターゲティング型DDS製剤に適したリガンドを有する生理活性物質及び製薬上許容される担体とからなる医薬組成物に関する。

以下において、本発明をより詳細に説明するが、まず最初に本明細書において使用する用語について説明しておく。

解離速度定数 (k_{off}) : リガンドのレセプターからの解離速度をそのときの表面結合量で除することにより示される値である。より具体的には、本発明のスクリーニング方法においてこの値を算出する場合の計算式を例示をすれば、次の数式として表すことができる。

$$k_{off} = X_{off} / \int_0^t X_s dt$$

(式中、 X_{off} は解離したリガンドの累積量を、 X_s はその時までの表面結合量をそれぞれ示す。)

即ち、 k_{off} は、解離したリガンドの累積量 (X_{off}) をその時までの表面結合量 (X_s) の積分値で除して求めることができる。

内在化速度定数 (k_{int}) : レセプターに結合したリガンドの内在化速度をそのときの表面結合量で除することにより示される値である。より具体的には、本発明のスクリーニング方法においてこの値を算出する場合の計算式を例示をすれば、次の数式として表すことができる。

$$k_{int} = X_{int} / \int_0^t X_s dt$$

(式中、 X_{int} は内在化したリガンドの累積量を、 X_s はその時までの表面結合量をそれぞれ示す。)

即ち、 k_{int} は、内在化したリガンドの累積量 (X_{int}) をその時までの表面結合量 (X_s) の積分値で除して求めることができる。

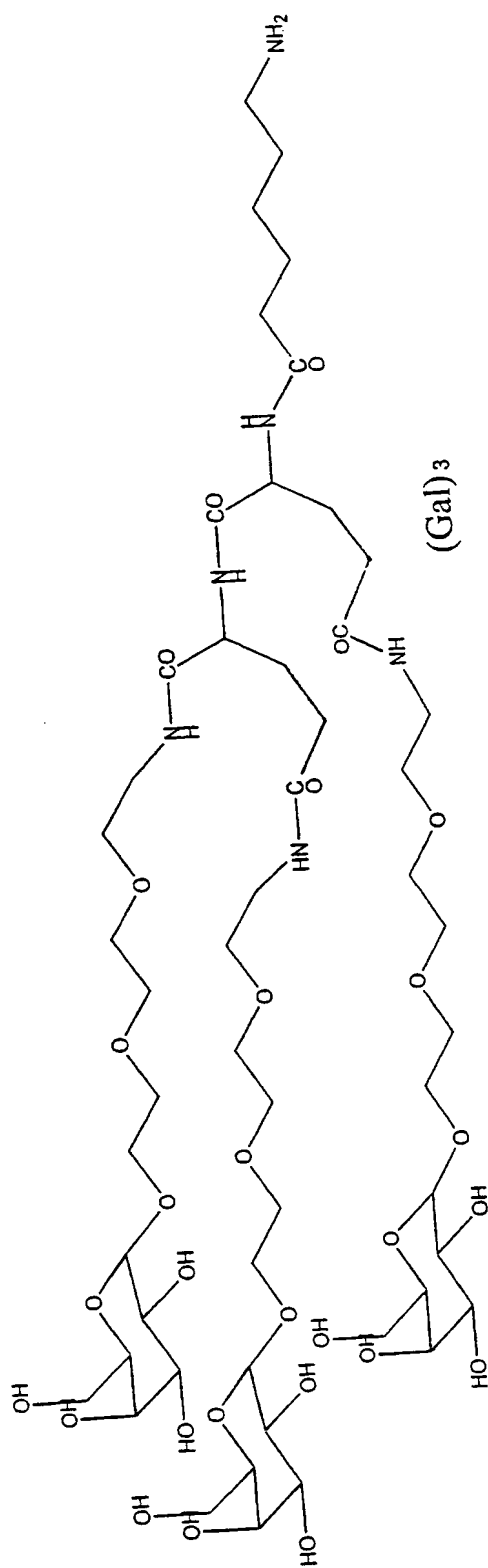
結合解離定数 (K_d) : 解離速度定数 (k_{off}) を、レセプターの結合速度定数 (k_{on}) で除した値として定義され、レセプターとリガンドとの親和性の尺度とされる。これを数式で示すと次式となる。

$$K_d = k_{off} / k_{on}$$

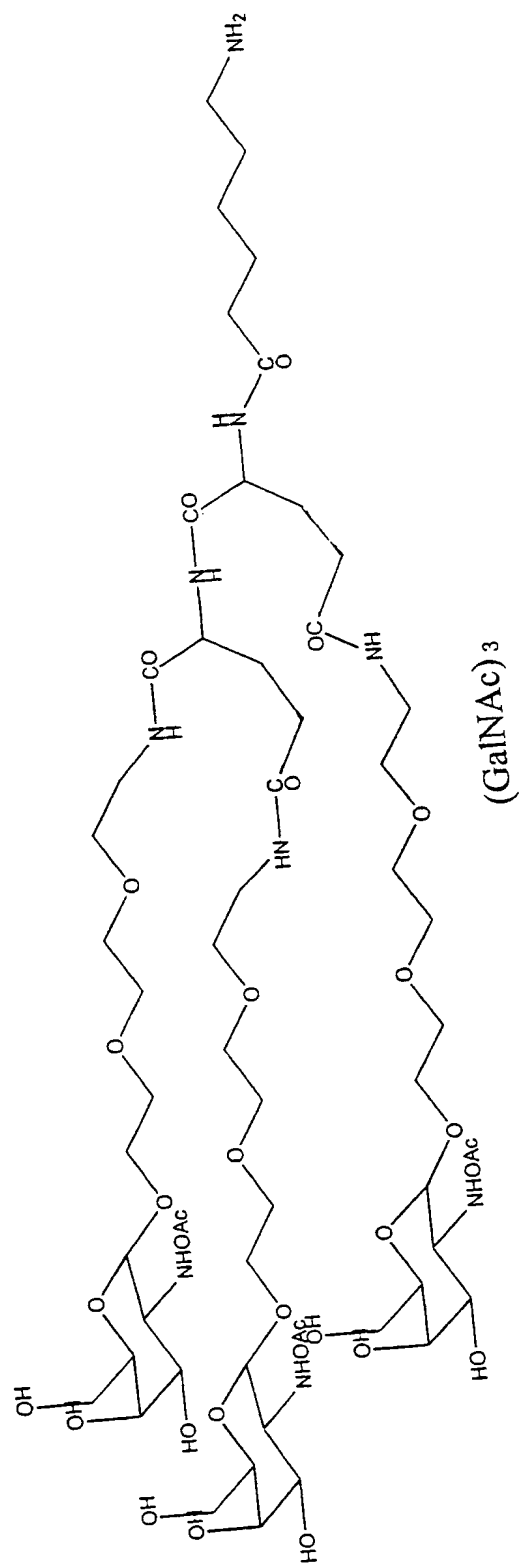
本発明者らは、肝臓などへ集積・滞留しうるリガンドの条件を探るため、すで

に各種のリガンドの合成法について報告している（WO 98 / 1 3 3 8 1）。

これらのリガンドの中で、まず、肝実質細胞上のアシアロ糖蛋白質レセプター（ASGPR）に対する２種類のリガンドである、次式



で示される 3 分枝型ガラクトースリガンド ((Ga1)₃) と、次式



で示される3分枝型N-アセチルガラクトサミンリガンド ($(\text{GalNAc})_3$) 及びそのIL-2への結合体について検討を行った。最初に、ASGP-Rに対する結合親和性の指標となるKd値を算出した。その結果を次の表1に示す。

表 1

各リガンドの ^{125}I -ASORのマウス肝細胞への結合に対する各リガンドの結合阻害定数 (Ki)

| | ASOR | (GalNAc) ₃ | (Gal) ₃ |
|------------------------|--------|-----------------------|--------------------|
| 1 | 0.0074 | 2.95 | 681 |
| 2 | 0.0044 | 0.65 | 351 |
| 3 | 0.0100 | 1.37 | 292 |
| Ave. (μM) | 0.0072 | 1.65 | 354 |
| s. d. | 0.0028 | 0.96 | 266 |

なお、結合阻害定数 (K_i) は結合解離定数 (K_d) と考えられるため、表 1 の K_i 値の結果から各リガンドの K_d 値が算出された。この結果、 $(\text{GalNAc})_3$ の K_d 値は $1.65 \mu\text{M}$ と親和性が比較的高かったのに対し、 $(\text{Gal})_3$ のそれは $354 \mu\text{M}$ と親和性が $(\text{GalNAc})_3$ の $1/200$ 程度の低親和性リガンドであることがわかった。このように親和性の異なるリガンドと IL-2 との複合体 ($(\text{Gal})_3$ -IL-2、 $(\text{GalNAc})_3$ -IL-2) のマウス肝ガンモデルでの腫瘍縮小効果を IL-2 を含め 3 者で比較した。その結果を次の表 2 に示す。

表 2

| (Gal) ₃ -IL-2、(GalNAc) ₃ -IL-2及びIL-2のマウス肝ガンモデルにおける抗腫瘍効果 | | | | | | |
|---|------------|---------|-------------|---------|--|---------|
| | 生理的食塩水 | | IL-2 | | IL-2 (Gal) ₃ -IL-2(Gal) ₃ -IL-2(GalNAc) ₃ -IL-2 | |
| | (low dose) | | (high dose) | | (low dose) (high dose) | |
| 腫瘍の大きさ(mm) | 6.83 | 1.60 | 1.55* | 0.65* | 0.53* | 3.72 |
| (S.D.) | (5.32) | (0.39) | (1.18) | (1.01) | (0.91) | (5.61) |
| 治癒数 | 0/5 | 0/7 | 0/6 | 4/7** | 5/7** | 0/7 |
| 死亡数 | 2/7 | 0/7 *** | 1/7 | 0/7 *** | 0/7 | 0/7 *** |
| | | | | | | 1/7 |

表 2 中の * は $p < 0.05$ (Dunnett's t-test) であることを示し、

* * は $p < 0.01$ (Fisher's protected LSD) であることを示し、

* * * は $p < 0.05$ (Fisher's protected LSD) であることを示す。

抗腫瘍効果の強さは $(Gal)_3-IL-2 > IL-2 > (GalNAc)_3-IL-2$ の順であることがわかった。IL-2 のターゲットは、肝細胞外液中に存在する IL-2 レセプターを表面に発現した抗腫瘍エフェクター細胞であることから、 $(Gal)_3$ リガンドにより IL-2 が効率的にエフェクター細胞を活性化できたことが示される。一方、高親和性リガンドである $(GalNAc)_3$ を結合させると、肝臓への集積性は向上するものの、肝局所でエフェクター細胞を効率的に活性化できないことが示された。そこで、 $(Gal)_3$ リガンドによる有用性の理由を明らかにするため、さらに肝細胞への取り込みに関する速度論的な解析を行った。

まず、細胞におけるレセプターあるいは抗原等の蛋白質に対するリガンドの取り込みに関する速度論モデルについて説明する。

第 1 図は、細胞表面におけるレセプターとリガンドの作用を速度論的に示したものである。第 1 図の下側が細胞内部であり、上側が細胞外部である。その中間に細胞表面が存在している。レセプター (R_s) は通常細胞膜を貫通して細胞外に出ており、そこで細胞外に存在するリガンド (L) と会合する。

第 1 図のレセプター (R_s) が、細胞外のリガンド (L) と一次の速度定数 ($k_{on}R_t$) で結合し、リガンドーレセプター複合体 (LR_s) を形成する。形成されたりガンドーレセプター複合体 (LR_s) は、内在化速度定数 (k_{int}) で示される速度で細胞内に取り込まれるか、あるいは、解離速度定数 (k_{off}) で示される速度でリガンドとレセプターが解離する。

細胞内に取り込まれたりガンドーレセプター複合体 (LR_i) は、分解速度定数 (k_{deg}) でリガンドが分解され、分解生成物 (X_{deg}) として細胞外に放出する。第 1 図中の V_r は、細胞表面にレセプターが出現するときの 0 次の速度定数であり、 k_i はリガンドと結合していないレセプターが細胞内に収納されるとき

速度定数を示している。

パルス追跡法 (Pulse chase法) によりこれらのリガンドの取り込み実験を行った。

^{125}I で標識化されたりガンド $^{125}\text{I} - (\text{Gal})_3 - \text{IL} - 2$ 、及び $^{125}\text{I} - (\text{GalNAc})_3 - \text{IL} - 2$ のマウス初代培養肝細胞への取り込み推移の結果を第2図及び第3図にそれぞれ示す。第2図及び第3図の、黒丸印 (●) はレセプター表面への結合画分量を示し、白四角印 (□) は細胞内へ内在化された画分量を示し、白三角印 (△) は細胞外に解離した画分量を示し、バツ印 (×) は分解生成物の画分量をそれぞれ示している。これらの値は、いずれも添加濃度で除することで分布容積 ($\mu\text{l} / \text{mg}$ 細胞蛋白質) の形で示した。

この実験系においてASGP-Rを介した特異的画分量が全体の90%以上を反映していたため、各画分量についてはすべて特異的な画分の推移を観察した。その結果、両者の取り込み推移には違いが見られた。即ち、細胞表面のASGP-Rへ結合した $(\text{Gal})_3 - \text{IL} - 2$ は、37℃でのインキュベーションにより主に培地中に解離し、細胞内へ取り込まれる画分の割合はそれに比べ低かった。これに対し $(\text{GalNAc})_3 - \text{IL} - 2$ においては取り込みが主であり、解離画分の割合はそれに比べ低い傾向にあることがわかった。

さらに、取り込みおよび解離についてインテグレーションプロット (X軸; t 分までの表面結合量の時間曲線下面積 (AUC)、Y軸; t 分後の取り込み又は解離量) を行い、その傾きから取り込み及び解離速度定数 (k_{int} 、 k_{off} (min^{-1})) を算出した結果を次の表3に示す。

表 3

^{125}I -(Gal)₃-IL-2と(GalNAc)₃-IL-2の肝細胞への取り込みに関する速度定数

| | $k_{\text{int}}(\text{min}^{-1})[\text{S.D.}]$ | $k_{\text{off}}(\text{min}^{-1})[\text{S.D.}]$ | $k_{\text{off}}/k_{\text{int}}$ |
|-----------------------------|--|--|---------------------------------|
| (Gal) ₃ -IL-2 | 0.0344[0.0110] | 0.0804[0.0110] | 2.34 |
| (GalNAc) ₃ -IL-2 | 0.0186[0.00515] | 0.0118[0.00257] | 0.601 |

表 3 の数値は 3 回の実験の平均値を示し、[] 内の数値は標準偏差 (S. D.) を示している。

この結果、 k_{int} には大きな違いが見られなかったが ($(Gal)_3-IL-2$; 0.034 min^{-1} 、 $(GalNAc)_3-IL-2$; 0.0184 min^{-1})、 k_{off} 値は $(Gal)_3-IL-2$ の方が $(GalNAc)_3-IL-2$ に比べ約 8 倍高く ($(Gal)_3-IL-2$; 0.0804 min^{-1} 、 $(GalNAc)_3-IL-2$; 0.0118 min^{-1}) になっていることがわかる。

このときの k_{off} と k_{int} の比 (k_{off}/k_{int})、即ち内在化回避能をみると、 $(Gal)_3-IL-2$ では 2.34 であるのに対して、 $(GalNAc)_3-IL-2$ では 0.601 であり、両者に大きな差があることがわかった。

次に連続インキュベーション法 (Continuous Incubation法) による取り込み実験により検討した。

^{125}I で標識化されたリガンド $^{125}I-(Gal)_3-IL-2$ 、及び $^{125}I-(GalNAc)_3-IL-2$ 及び $^{125}I-IL-2$ のマウス初代培養肝細胞への取り込みの推移の結果を第 4 図、第 5 図及び第 6 図にそれぞれ示す。第 4 ~ 6 図の、黒丸印 (●) は細胞表面に結合した画分量を示し、黒四角印 (■) は細胞に取り込まれて内在化した画分量を示し、白三角印 (△) は分解生成物の画分量をそれぞれ示している。これらの値は、いずれも添加濃度で除することで分布容積 ($\mu\text{l}/\text{mg}$ 細胞蛋白質) の形で示した。

この実験系でも培養媒体中に遊離の $GalNAc$ を存在させ $ASGP-R$ を介する特異的な画分とそれ以外の非特異的な画分を分離評価した。 $(Gal)_3-IL-2$ 及び $(GalNAc)_3-IL-2$ については、前記したパルス追跡法と同様に 80% 以上を占める特異的な画分量を示した。 $IL-2$ においては大部分が遊離 $GalNAc$ で追い出されない非特異的な結合、取り込み、及び分解が見られていることから、全部の画分量を示した。

その結果、 $(Gal)_3-IL-2$ 、 $(GalNAc)_3-IL-2$ の取り込みの推移は、共にインキュベート直後に肝細胞表面への結合と細胞内への取り込み

が観察され、定常状態に達した後に培地中での分解物量が上昇した。これは典型的なレセプターを介したエンドサイトーシスによるものである。ただし、その取り込み容積の絶対値は (G a l N A c) ₃- I L - 2 の方が (G a l) ₃- I L - 2 に比べ 4 ~ 5 倍程度高く、 (G a l N A c) ₃- I L - 2 の方が肝臓での消失クリアランスが高い傾向にあることが示された。これらの結果をもとに両者の各画分推移についてナップ (N a p p) を用いたフィッティング (F i t t i n g) を行ない (Hisaka A, et al., J. Pharmacokinet. Bioparm., 26(5), 495-519(1998))、取り込みに関する速度定数を算出した。なお、フィッティングにおいてはパルス追跡法により得られた k_{off} / k_{int} の比を固定して行なった。即ち、 (G a l) ₃- I L - 2 の場合には、 $k_{int} = k_{off} \times 0.428$ とし、 (G a l N A c) ₃- I L - 2 の場合には、 $k_{int} = k_{off} \times 1.576$ とした。

表 4

^{125}I -(Gal) $_3$ -IL-2と ^{125}I -(GalNAc) $_3$ -IL-2の肝細胞への取り込みに関する速度定数

| | $k_{\text{int}}(\text{min}^{-1})$ | $k_{\text{off}}(\text{min}^{-1})$ [S.D.] | $k_{\text{deg}}(\text{min}^{-1})$ [S.D.] | $k_{\text{on}}\text{Pt}(\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg cell protein})$ |
|---------------------|-----------------------------------|--|--|---|
| (Gal) $_3$ -IL-2 | 0.0896 | 0.2094(0.0806) | 0.0183[0.0023] | 0.9864[0.0520] |
| (GalNAc) $_3$ -IL-2 | 0.0451 | 0.0286(0.0053) | 0.0232[0.0029] | 2.4329[0.1074] |

この結果、パルス法により得られた値にほぼ等しい k_{int} 及び k_{off} 値に加え、それぞれの分解速度定数 (k_{deg} (min^{-1})) 及び結合クリアランス ($k_{on}Rt$ ($\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg cell protein}$)) が得られた。 k_{deg} については (Gal)₃-IL-2、(GalNAc)₃-IL-2 で大きな違いが見られなかったが、 $k_{on}Rt$ については (GalNAc)₃-IL-2 の方が約 2.5 倍高い値を示した。

一方、IL-2 に関しても、取り込み機構については不明であるが ASGPR を介さない非特異的な取り込みによる分解が観察された。その分解速度定数の指標となる推移の傾きは (Gal)₃-IL-2 のその約 1/3.33 と、未修飾 IL-2 の場合にも、生体内において肝臓における消失が無視できないものであると判断した。この傾きの比 ($f = 3.33$) から後述する実施例で示した方法により IL-2 の肝クリアランス (CL_h) が、 $2.94 \text{ ml}/\text{min}/\text{kg}$ であると思積もられた。

次に、リガンドの生体内における動態モデルについて説明する。以上の実験で使用してきた、(Gal)₃-IL-2、(GalNAc)₃-IL-2 及び IL-2 の生体内における薬効の違いを説明する為、生理学的な知見に基づいた薬物動態モデルを構築した。これを第 7 図に示す。

使用したパラメーターはインビボ及びインビトロの実験で得られた薬物動態及び速度論パラメータ並びに生理学的パラメータであり、これを以下に示す。

- $k_{on}Rt$; レセプターに対するリガンドの会合クリアランス^{a)}
- k_{off} ; リガンドーレセプター複合体の解離速度定数^{a)}
- k_{int} ; リガンドーレセプター複合体の内在化速度定数^{a)}
- k_{deg} ; 内在化されたリガンドーレセプター複合体の分解速度定数^{a)}
- F ; インビトロからインビボへの相関係数^{b)}
- V_b ; 血漿中の分布容積^{c)}
- V_e ; 肝臓の細胞外液の容積 ($0.2 \times 1.3 \times 1000 / 22 = 11.8 \text{ ml}/\text{kg}$)

- Q_H ; 肝臓における血漿流量^{c)}
 CL_{other} ; 肝臓以外でのクリアランス^{d)}
 CL_h ; 肝臓での非特異的クリアランス^{e)}
 $Dose$; リガンドの投与量 ($5 \times 10^4 \text{ ng/kg}$)
 $K_{d_{IL2}}$; IL-2 レセプターに対する解離定数 (0.155 ng/ml)

注: (a) は実験値 (表 3 参照)

(b) はインビトロとインビボの実験から得られた推定値で、36.9 とした。

(c) はインビボでの実験から得られた値である。

(d) は実際のクリアランスから得られる実験値を用いた。

(e) はインビトロの IL-2 の取り込み実験から得られた値である。

リガンド修飾 IL-2 はともに主要な分布並びに消失臓器が肝臓であるため、肝細胞外液と血液循環系からなる単純なコンパートメントの生理学的な薬物動態モデルとした。これをもとにステラ (Stella) (Bogen et al., Science, 246: 138-142 (1989)) を用いてシュミレーションを行い、体内動態の予測計算を行なった。IL-2 については実験的に観察された肝臓における非特異的な消失クリアランスをモデルに加え、ASGP-R への結合クリアランスを 0 とした。なお、各画分中のリガンド-IL-2 ハイブリッド体濃度に関する速度式を下記に示す。

(血漿中画分)

$$dC_b/dt = (-Q_H * C_b + Q_h * C_e) / V_b$$

(肝細胞外液中画分)

$$dC_e/dt = (Q_H * C_b - k_{on} R_T * C_e * F + k_{off} * X_s - Q_h * C_e) / V_e$$

(肝細胞表面結合画分)

$$dX_s/dt = k_{on} P_t * C_e * F - (k_{off} + k_{int}) * X_s$$

(肝細胞内画分)

$$dX_i/dt = k_{int} * X_s - k_{deg} * X_i$$

(分解画分)

$$dX_{deg}/dt = k_{deg} * X_i$$

(レセプター占有率)

$$Receptor\ Occupancy = C_e / (K_d + C_e)$$

この場合リガンド-IL-2あるいはIL-2の細胞外液中からの運命としては、①ASGP-R表面への結合→②肝細胞内への取り込みもしくは細胞外液中への解離→③エンドサイトーシス機構による分解の経路(A)と、①'細胞外液中での抗腫瘍エフェクター細胞表面への結合(→②'エフェクター細胞の活性化)の経路(B)の2つを想定している。(B)の経路へ移行するIL-2の量や滞留時間を増加させる方向へ進めさせることにより、肝臓局所でのIL-2の抗腫瘍効果が高まると考えられる。逆に(A)の経路へ移行するIL-2量の割合が高すぎると、分解を受け過ぎることにより血中滞留性の低下が起こるため、IL-2が肝臓局所において十分な薬理作用を発揮できない。

前記で説明したパラメーターのうち、(a)については(Gal)-IL-2の取り込み実験データから得られた値を、(b)の肝臓以外の臓器による取り込みクリアランスについては体内動態実験で得られた(Gal)-IL-2の腎取り込みクリアランスの値を用いた。(c)のIL-2についてのみの肝クリアランス(CL_{NSP})は、連続インキュベーション法により得られたIL-2の非特異的な取り込みによる分解速度と(Gal)-IL-2の分解速度との比がそれぞれの肝固有クリアランスの比に等しいとにおいて計算した。ここで、(Gal)-IL-2の固有クリアランス(CL_{int h})は、

$$CL_{int h} (Gal) = \frac{F * k_{on} R_t (Gal) * k_{int} (Gal)}{(k_{off} (Gal) + k_{int} (Gal))}$$

にて表される。ここに、Fは前記した換算定数であり、その算出法は後述する。

また、使用したパラメーターのうち肝細胞外容積(V_e)は、その容積が臓器重量の約20%であるという宮内らの報告(S. Miyauchi, et al., J. Pharmacokin. Biopharm. 15: 25-38 (1987))より算出した。

Q_H (肝血漿流速) 及び F (インビトロで得られた $k_{on}Rt$ (結合クリアランス) のインビボモデルへの換算定数) は以下のようにして求めた。即ち、 ^{125}I 標識体の静注後の体内動態検討により得られた $(Gal)_3-IL-2$ 、 $(GalNAc)_3-IL-2$ のそれぞれの肝取り込みクリアランス $CL_{uptakeLi}$ は、投与初期での肝臓への分布を測定している為、インビトロ実験で算出した結合クリアランス ($k_{on}Rt$) を主に反映していると考えられる。肝取り込みに関する固有クリアランス ($CL_{int, uptake}$) は、

$$CL_{int, uptake} = k_{on}Rt \times F$$

(ここで、 F はインビトロからインビボへの換算定数) となるべきである。従って、ウエルステアードモデル (Well-stirred model) に従えば下記のようなになる。

$$CL_{uptakeLi} = Q_H * CL_{int, uptake} / (Q_H + CL_{int, uptake})$$

ただし、 $CL_{int, uptake} = F \times (k_{on}Rt, vitro)$ である。

これについて $(Gal)_3-IL-2$ 、 $(GalNAc)_3-IL-2$ のそれぞれの連立方程式を解くことにより Q_H 及び F の値を算出した。

また、 $IL-2$ 依存性の $CTL-2$ 細胞を用いたインビトロ生物活性測定において修飾による生物活性の低下が見られなかったことから、リガンド- $IL-2$ 及び $IL-2$ の $IL-2$ レセプターに対する解離定数は全て同じ値 ($K_d = 10 pM$; 高親和性) に設定した。

これらの結果から、2種リガンド修飾 $IL-2$ 及び未修飾 $IL-2$ の生体内での動態の違いの原因をそれぞれの薬物動態の比較により解明する為、インビボならびにインビトロの実験から実測された値をもとに生理学的モデルによる予測計算を行った。リガンド- $IL-2$ ハイブリッド体の血漿中濃度 (第8図)、肝細胞外液中濃度 (C_{ext}) (第9図) 及びハイブリッド体による $IL-2R$ の占有率 (RO) (第10図) の時間推移のシュミレーションの結果を第8図、第9図及び第10図にそれぞれ示す。第8図、第9図及び第10図の、太い実線は $(Gal)_3-IL-2$ を示し、細い実線は $(GalNAc)_3-IL-2$ を示し、破線は未修飾 $IL-2$ をそれぞれ示している。

薬効が最も低い傾向にあった (GalNAc)₃-IL-2 は、投与後初期から約 10 分までの血漿中及び肝細胞外液中からの消失が他のものに比べ非常に速いことがわかった。従って本リガンドは投与後速やかに ASGP-R を介した消失により血中濃度が大きく低下してしまうことが確認された。ただし、10 分後からの滞留性は最も高かった。これはおそらく ASGP-R に強く結合した画分が徐々に循環血中へ放出される為ではないかと推測される。薬理作用の指標と考えられる IL-2 レセプターの占有率 (第 10 図) は投与後約 55 分まで最も低かったが、投与 10 分からの低下は比較的に緩やかであった。

薬効が 2 番目に高い傾向にあった IL-2 は投与直後の血漿中濃度及び肝細胞外液中濃度 (C_e e x t) は最も高かったが、それ以降の血中並びに肝細胞外液中における滞留性が観察されず、投与 30 分後に (Gal)₃-IL-2 と、約 50 分後に (GalNAc)₃-IL-2 と濃度が逆転した。RO についても同様な傾向を示し、投与後約 30 分までは他に比べ最も高かったものの、その低下が最も速かった。従って、IL-2 については投与後ある程度時間が経った以降の滞留性に問題があることが示唆された。

これに対し薬効がもっとも高い傾向にあった (Gal)₃-IL-2 は、(GalNAc)₃-IL-2 及び IL-2 が示した時間推移の特徴をそれぞれ併せ持つ中間的な推移を示した。即ち、投与直後の血漿中濃度、及び C_e e x t とともに両者の中間程度の値であり、10 分後からの滞留性もほぼ両者の間程度であった。このような特徴を有することから RO については投与後 30 分までは IL-2 よりわずかに低い値を示すものの大きな違いは見られず、その後 80 分までもっとも高い値で推移した。

さらに、前記した予測計算により算出されたそれぞれの薬物動態パラメーターとなる平均滞留時間 (MRT (分))、全身クリアランス (C_{L, total} (ml/分/kg))、分布性 (V_{dss} (ml/kg))、IL-2 レセプターの 75% 占有時間 (分) 及び肝細胞外液中濃度の時間曲線下面積 (AUC) (AUC_{0-∞} (C_e e x t) (ng*分/ml)) を比較した結果を次の表 5 に示す。

表 5

(Gal)₃-IL-2、(GalNAc)₃-IL-2及びIL-2の予測計算により算出された薬物動態パラメーター

| パラメーター | (Gal) ₃ -IL-2 | | (GalNAc) ₃ -IL-2 | IL-2 |
|---------------------|--------------------------|-------|-----------------------------|-------|
| MRT | (min) | 11.1 | 9.72 | 8.33 |
| CL _{total} | (ml/min/kg) | 10.6 | 22.2 | 5.62 |
| Vd _{ss} | (ml/kg) | 117 | 216 | 46.8 |
| IL-2Rの75%占有時間 | (min) | 56 | 37 | 48 |
| AUC0-∞ (Ce extra) | (ng*min/ml) | 38012 | 7557 | 67277 |

まず全身におけるパラメーターを比較してみると、血中からのリガンド消失能力の指標となる全身クリアランス (CL_{total}) は、(GalNAc)₃-IL-2 が最も高く、(Gal)₃-IL-2 はその 1/2 程度、最も低い値を示す IL-2 はその 1/4 程度であった。薬物が分布する容積の指標となる分布容積 (V_{dss}) についても同様に肝臓移行性の高さを反映し、(GalNAc)₃-IL-2 > (Gal)₃-IL-2 > IL-2 の順となった。薬物速度論に基づけばリガンドの血中並びに肝細胞外液中濃度の減少の速さは、これらの消失能力 (CL_{total}) と分布性 (V_{dss}) のバランス (比) によって決定される。このバランスを表すパラメーターの 1 つである平均滞留時間 (MRT) を計算すると、(Gal)₃-IL-2 が最も高い値を示した。これは (Gal)₃-IL-2 が ASGPR への適度な親和性並びに内在化速度を示す為、血中消失がある程度抑えられつつ、かつ ASGPR に結合し、そこに滞留することによる肝細胞外液滞留効果を示している結果であると考えられる。以上の結果から、薬効の最も高かった (Gal)₃-IL-2 は全身からの消失、及び滞留性の両面で IL-2、(GalNAc)₃-IL-2 に対し、バランスの取れた性質を有することが示された。

肝臓の IL-2 レセプターに対するリガンドの暴露 (exposure) を表す指標の一つと考えられる肝細胞外液中濃度の AUC ($AUC_{0-\infty} (C_{ext})$) を、両リガンド修飾体で比較してみると、(GalNAc)₃-IL-2 は (Gal)₃-IL-2 のその約 1/4.4 程度であり、両者の薬効の違いを反映したものであった。しかし、IL-2 の $AUC_{0-\infty} (C_{ext})$ が (Gal)₃-IL-2 よりも高い結果は、薬効の面で (Gal)₃-IL-2 よりも劣っていた結果とは一見矛盾していた。IL-2 の $AUC_{0-\infty} (C_{ext})$ が高いのは投与直後から 10 分後までの血中濃度が高いためである。IL-2 並びに両リガンド修飾体の効果は、IL-2 R への結合を介して発揮されることから、この指標は (Gal)₃-IL-2 のもつ血中滞留性の高さが十分反映されていないと考えられる。

そこで、IL-2 R の 75% 占有時間を計算したところ、薬効の強さを反映し、(Gal)₃-IL-2 > IL-2 > (GalNAc)₃-IL-2 の順となった。

よって、IL-2の薬効は $AUC_{0-\infty}(C_{e,ext})$ の大きさも重要な因子の一つではあるが、IL-2Rを適度に飽和されるだけの肝細胞外液中における有効な薬物濃度の滞留性もIL-2の薬効に非常に重要であることが示唆された。

これまでの検討から今回用いた2つのリガンドのうち、 $(Gal)_3$ が「血中消失」、「肝細胞外液中での滞留性」の2つのバランスを最もほどよく有していることが明かとなった。次により薬効発現の面ですぐれたリガンドの設計を行うため、 $(Gal)_3$ -IL-2のパラメーターを基に本生理学的モデルにおいて種々の設定条件によるシミュレーションを行った結果の血漿中濃度の推移を第11図に、肝細胞外液中濃度の推移を第12図に、及びIL-2レセプターの占有率(R_O)の時間推移を第13図にそれぞれ示す。

第11図、第12図及び第13図の各図は、 k_{int} を一定として k_{off} の値を変化させたものである。即ち、各図の(A)は k_{int} の値が $0.0896/min$ (これは $(Gal)_3$ -IL-2の場合の値である。)の場合、(B)は k_{int} の値が $0.00896/min$ (これはAの $1/10$ 量)の場合、(C)は k_{int} の値が $0.000896/min$ (これはAの $1/100$ 量)の場合を示している。そして、各図の k_{off} の値は $(Gal)_3$ -IL-2の場合の値である 0.209 (破線、各図中の1)を中心にして、その10倍(点線、各図中の2)、100倍(細点線、各図中の3)および $1/10$ 倍(実線、各図中の4)、 $1/100$ 倍(細破線、各図中の5)と変化させた場合を示している。

$k_{int} = 0.0896/min$ の場合(第11図、第12図及び第13図の(A))、 k_{off} 値の増加に伴い血漿中及び肝細胞外液中のリガンド-IL-2ハイブリッド体濃度が高まり、その滞留性も向上することが示された。同様にIL-2レセプターへの占有率も k_{off} 値が高い方が高く、しかもより長く滞留することが示された(第13図の(A))。このような効果は k_{off} 値が高まることにより肝臓からのクリアランスが押さえられ(ASGPRに結合したリガンドの大部分が取り込みを受けずに細胞外液中へ解離するため)、循環血中ならびに肝細胞外液中へリザーブされるからと考えられる。よって、 $(Gal)_3$ -IL-2の方が $(GalNAc)_3$ -IL-2に比べ肝臓モデルにおいて薬効が強かったのは、 $k_{off} > k_{int}$ である $(Gal)_3$ -IL-2の方が、 $k_{off} < k_{int}$ である $(Ga$

1 N A c) β -I L-2 に比べ肝細胞外液中濃度及び滞留性が高まり、I L-2 R の占有率が高まったためであると推測される。

これらの結果、 k_{off} が細胞内への内在化に打ち勝つべく、 k_{int} に比べ高い値であることが重要であることがわかった。ただし、 k_{off} の値を (G a l) β -I L-2 の測定値の 100 倍としても肝細胞外液中濃度は徐々に消失している。これは設定した k_{int} では ((G a l) β -I L-2 にもあてはまる) 肝臓での取り込み (内在化) の影響が強すぎるため、それに打ち勝つだけの k_{off} の値を設定すると、レセプター (A S G P-R) からの解離が極めて速くなるため血中消失の決定因子が腎臓などの他臓器による消失となるためと考えられる。

そこで、 k_{int} の値をさらに $1/10$ 、 $1/100$ と低下させてシュミレーションを行った結果、 k_{off} の値を k_{int} に比べある程度高めることによりその肝細胞外液中濃度および I L-2 レセプターの占有率の滞留性が高まることが示された (第 12 図及び第 13 図の (B) 並びに第 12 図及び第 13 図の (C))。第 12 図の (B) と (C) の結果を比較すると、このような滞留効果は内在化速度が低いほど強い傾向にあった。ただし、両者においていずれも k_{off} の値には至適範囲があり、これがあまり速くなると逆に滞留性が低下した。これは解離があまりにも速いとレセプター (A S G P-R) との親和性が低くなり滞留部位としてのレセプター効果が発揮できないことを意味する。このように A S G P-R からの解離は内在化に比べれば速やかである方が血中滞留性の維持にとっては好都合である反面、ある程度以上速くなると A S G P-R のもつリガンドの滞留部位としての機能を失うため、適切な I L-2 レセプター占有率の維持にとって k_{int} の絶対値並びに k_{int} と k_{off} とのバランスも重要であることがわかった。

そして、以上の 3 検体についての速度論モデル解析結果をまとめると次のようになる。

(1) C L_{total}で表される血中消失の効率については I L-2 が最も有利で (G a l N A c) β -I L-2 が最も不利であり、(G a l) β -I L-2 は両者の中間の適度なものであった。その理由は (G a l N A c) β -I L-2 及び (G a l) β -I L-2 では、A S G P-R を介したエンドサイトーシスを受けるのに対し、I L-2 は受けないからである。(G a l N A c) β -I L-2 の消失効率

が大きいのは、インビトロの実験で証明されたように肝クリアランス (CL_h) が高くその効率が大きい為である。

(2) Vd_{ss} で表される肝細胞外液中における滞留性効果は (GalNAc)₃-IL-2 が最も有利で、IL-2 が最も不利であり、(Gal)₃-IL-2 は同様に両者の中間の適度なものであった。その理由は (GalNAc)₃-IL-2 及び (Gal)₃-IL-2 では ASGP-R に結合することによってそこに長時間滞留することができるのに対し、IL-2 では滞留できないからである。

(3) 実験的に求められた薬効が (Gal)₃-IL-2 > IL-2 > (GalNAc)₃-IL-2 であったことを考えると、上の2つの要因のバランスが重要であることが示唆される。つまり、(Gal)₃-IL-2 は程よい効率で血中から消えることである程度の血中濃度が維持されながら、レセプターにある程度の親和性をもってそこに滞留できたと考えられる。

(4) そのような両要因のバランスを示す体内動態パラメーターを検索することは困難であるが、その一例として MRT を計算すると確かに薬効が一番大きく観察された (Gal)₃-IL-2 が最も高い。さらに IL-2 R との親和性を考慮してレセプター占有率を計算すると 75% を占有する時間をもっとも長いのは (Gal)₃-IL-2 であり、最も短いのが (GalNAc)₃-IL-2 となり、本速度論モデルを用いた解析が 2 種リガンド修飾 IL-2 及び未修飾 IL-2 の薬効の違いをある程度説明できることが分かった。

このように、「血中消失効率」、「肝細胞外液中での滞留性」という2つの薬物動態学的パラメータのバランスが、本リガンド群の薬効発現において極めて重要であり、本生理学的モデルを用いることによってこれら2つの要因を考慮に入れた、動態/薬効の評価/予測が可能であることが示された。今回実験に使用した3検体の中では、これらのバランスがもっともとれている (Gal)₃-IL-2 が、IL-2 の肝局所における抗腫瘍エフェクター細胞の活性化をもっとも効率よく行なうことができた。このものが最も強い薬効を示した理由は、以上の実験で示された速度論的考察によるものと考えられる。

上記結果に基づき「血中消失効率」、「肝細胞外液中での滞留性」という2つの

薬物動態学的パラメータのバランスを両立させたターゲティング型DDS製剤を製造する上で必要なリガンドを考える場合には、標的組織の細胞が薬物を取り込んで代謝、分解させる機能を有するレセプターに対する内在化速度定数 (k_{int}) と解離速度定数 (k_{off}) とのバランスをとることが重要であり、この比 (k_{off}/k_{int}) で示される当該レセプターへの結合を介した内在化回避能とレセプターへの結合親和性の強さ ($1/K_d = k_{on}/k_{off}$) とを指標としてスクリーニングすればよいことが示された。

本発明の内在化回避能をさらに詳細に説明すると次のようになる。

- (1) 比 (k_{off}/k_{int}) で示される内在化回避能が1より大きいことが好ましい。
- (2) 内在化速度定数 (k_{int}) はできるだけ小さいほうが好ましい。
- (3) 解離速度定数 (k_{off}) は適度な大きさに抑えることが好ましい。

解離速度定数 (k_{off}) の方が、内在化速度定数 (k_{int}) より大きくすることにより ($k_{off}/k_{int} > 1$)、肝クリアランスが低くなり血中消失効率が低くなり、肝細胞外液中濃度及びIL-2Rの占有率を高く保持できる。内在化速度定数 (k_{int}) が如何なる場合でも解離速度定数 (k_{off}) が上昇すれば肝細胞外液中の薬物濃度-時間曲線下面積 (AUC) を増大させることができる。

また、内在化速度定数 (k_{int}) をできるだけ小さくすることにより内在化による肝クリアランスを低くすることができ、肝細胞外液中におけるリガンド-蛋白質ハイブリッド体の滞留性を上げることができる。

さらに、解離速度定数 (k_{off}) を大きくすることにより肝細胞外液中での滞留性は上昇するが、あまり大きくなり過ぎると逆に滞留性の効果は低下してしまう。これはASGP-Rによるリザーバーとしての機能がなくなるからである。解離速度定数 (k_{off}) が大きくなるに連れて血中消失カーブを決める要因がASGP-Rからの解離による血中への供給から腎臓等他臓器による消失になるため、一種のフリップフロップが見られる。したがって、解離速度定数 (k_{off}) はこのようなフリップフロップが起こる大きさ以下に抑えることが好ましい。

本発明は、ターゲティング型DDS製剤を製造上で重要となるリガンドをスクリーニングする際の指標を提供するものである。したがって、本発明の方法は有効成分としての薬物やリガンド及び標的組織の細胞表面におけるレセプターや抗原等の蛋白質の具体的な状況に制限されるものではなく、リガンドを選択する際のスクリーニングの指標を提供するものである。以下では、より具体的に本発明の実施の態様を説明してゆくが、本発明はこれらの具体的な態様に限定されるものではない。

本発明のリガンドとしては、ターゲティング型DDS製剤としての標的組織の細胞に親和性があるものであればよく、リガンド自体が薬物としての作用を有するものであってもよいが、好ましくはリガンド自体に生理活性が無いものがよい。このようなりガンドとしては、薬物と結合し得る官能基を有しており、かつ生体内において副作用を示さないものであれば特に制限はない。このようなりガンドを本発明のスクリーニング方法によってスクリーニングすることができるし、また本発明の開示に従って速度論的に解析して、最適なものに設計することができる。

また、リガンドは細胞の特定のレセプターとある程度、好ましくは解離定数が10 mM以下であるようなある程度の親和性を有することが必要である。

本発明における標的組織の細胞表面における特定のレセプターや抗原等の蛋白質としては、リガンドに親和性を有するものであり、好ましくは薬物と親和性を有さないものがよい。また、ターゲティング型DDS製剤とするためには、当該レセプターは組織に特異的なものが好ましいが、本発明の開示に従えば必ずしも特異的である必要はなく、標的とする組織にリガンドが集積し得るレセプターであればよい。例えば、肝臓を標的組織とする場合には、肝実質細胞に多数存在するアシアロ糖蛋白質レセプター(ASGPR)などが好ましい。

より具体的の本発明の細胞表面のレセプターや抗原などの蛋白質の対象となりうるものの具体的な条件を例示するならば、下記の3点のいずれかを満たせば良いと考えられる。

1. $R_t \times k_{int} / K_d >$ 他臓器での固有のクリアランス

であるようなレセプター密度 (R_t) を有するもの。ここで R_t は、細胞表面蛋白質の B_{max} で代用することができる。

ここに、 B_{max} は結合容量を意味し、結合実験におけるスキャッチャードプロット (Schatchard plot) 解析によって算出された結合最大量を細胞数ないしは細胞蛋白質量で規格化することによって得られる値である。実験的には、

$$B_{max} = C_b * (C_f + K_d) / C_f$$

(ただし、 C_b は結合型濃度、 C_f は非結合型濃度、 K_d は結合解離定数)

によって測定した値から算出することも可能である。

2. 細胞表面レセプターあるいは蛋白質が標的臓器のみに発現しているもの。

例えば、アシアロ糖蛋白質レセプターのようにほぼ完璧なレセプターが挙げられる。

3. 細胞表面のレセプターあるいは蛋白質が他臓器に比べ標的臓器に高く発現しているもの。例えば、標的臓器での発現率と他臓器での発現率との比が、1 を越えるものが好ましい。

このような条件を満たすレセプターとしては例えば、実施例における肝実質細胞上のアシアロ糖蛋白質レセプター (ASGP-R) 以外に、肝臓の非実質細胞上にかなり選択的に発現しているマンノースレセプターが考えられる。また、上皮細胞成長因子 (EGF) レセプター、インスリンレセプター、トランスフェリンレセプター、フォーレート (folate) レセプターなどについては発現に細胞特異性が低いものの R_t が高いので、その発現特異性が高い臓器については対象となりうる。

また、特定の癌細胞での発現が正常細胞に比べ高まるものについても、標的となる。一方、レセプター以外の細胞膜上に発現する蛋白質としては例えば、各種トランスポーターや抗原等がその標的となりうる。ただし、標的となる細胞膜上の蛋白質に対するリガンドのデザイン及びスクリーニングは、レセプターに対するものの方がそれ以外の発現蛋白質に比べ容易であるためより好ましい。

本発明の薬物としては、生理活性を有するものであればよく、それ自体に生理

活性があるものであってもよいが、それ自体には生理活性が無い場合であってもリポソームやリピッドマイクロスフェアなどのように生理活性物質のキャリアーとなるものであってもよい。また、薬物自体が前記したリガンドの機能を有するものであってもよい。

本発明の薬物としては、リガンドとの結合による活性への影響が少なく、体内動態を大きく変化させる事が可能な生理活性蛋白質が好ましい。また、標的組織の病変した細胞に特異的に取り込まれて活性を示すか、又は免疫系細胞に作用する薬物も本発明の好ましい薬物のひとつである。さらに、本発明の薬物としては、生体内において局所で必要な時に必要量発現され、種々の機能を担っているものであって、全身投与した場合に標的部位以外への分布による種々の副作用を生じ、速やかに消失するためインビボで効果を得るのに頻回あるいは大量投与を必要とする薬物が好ましい。

本発明で使用される薬物は、本発明のリガンドと組み合わせることにより、薬物の標的細胞又は臓器中への集積効率を高め、しかも持続的な効果を発揮させることが可能なDDS製剤を構築することができる。

このような薬物としては、具体的には、例えば、インターロイキン類、インターフェロン $\alpha/\beta/\gamma$ 、腫瘍壊死因子(TNF)等のサイトカイン類、肝細胞成長因子(HGF)や上皮細胞成長因子(EGF)等の細胞増殖調節因子、スーパーオキシドディスムターゼ(SOD)やカタラーゼ、チオレドキシニンなどの抗酸化酵素などの生理活性蛋白質が挙げられる。このような生理活性蛋白質はその由来を問わず、動物由来のものであっても、植物由来のものであっても、微生物由来のものであってもよい。また、大腸菌、酵母、チャイニーズハムスターオバリ細胞などにこれらの蛋白質の遺伝子又はその変異体を組み込んで発現させて生産された蛋白質であってもよい。さらに他の蛋白質とのキメラ体であってもかまわない。また、本発明の生理活性蛋白質は、共存蛋白質による影響を最小限に抑える為、使用前に可能な限り精製しておくことが望ましい。

また、生理活性蛋白質以外にもアドリアマイシン、マイトマイシンC、メトトレキセート等の抗がん剤やアジドチミジン(AZT)、アデニンアラビノシド(arabA)等の抗ウイルス剤のように毒性が強く標的部位以外への分布による

副作用が問題となる低分子薬物についても対象となりうる。さらに、このような毒性の高い低分子薬物等の運搬体として注目されているアルブミンやグロブリンなどの天然蛋白質、各種モノクローナル抗体あるいはその一部、デキストラン、キチン、キトサン、イヌリンなどの多糖類、ポリリジン、ポリグルタミン酸などのポリアミノ酸、ジビニルエーテル無水マレイン酸共重合体（D I V E M A）、スチレン無水マレイン酸共重合体（S M A）、ポリエチレングリコール（P E G）、ポリビニルアルコールなどの合成高分子、さらにはリポソームやリピッドマイクロスフェア等の脂質集合体キャリアーなどについても、その表面へのリガンド導入によりキャリアー自身の体内動態制御が可能となることからその対象となりうる。

本発明のリガンドと薬物とは、通常の方法により結合させることができる。結合は共有結合が好ましいが、これに制限されるものではない。リガンドと薬物の結合は化学的方法で行うこともできるが、トランスグルタミナーゼなどの酵素を用いた方法により行うこともできる。

薬物へのリガンド導入法としてはつぎのようなものが挙げられる。まず薬物が蛋白質の場合にはリガンド導入した複合体の構造が均一で、その生物活性が低下しない事が医薬品開発を行なう上で望ましいため、本発明者らが開発したアルキルアミン導入型リガンドのトランスグルタミナーゼを利用した特定の G l n 残基のみへの位置選択的修飾法（特願平 6 - 1 9 8 1 8 7 号）が望ましいが、これに限定されるものではない。

さらに、他の導入法としては、S P D P（N-Succinimidyl3-(2-pyridyldithio)propionate）、S M P T（Succinimidylloxycarbonyl- α -methyl- α -(2-pyridyldithio)toluene）、S M C C（Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate）等を導入したリガンドによる蛋白質中の C y s 残基のみの選択的修飾法も考えられる（Goodson and Katre, 1990, Biotechnology 8, 343-346, Benhar et al., J. Biol. Chem. 269, 13398-13404）。さらには、蛋白質の N 末端アミノ酸が S e r あるいは T h r である天然あるいは遺伝子組換え型蛋白質に対し、p H 等の反応条件をコントロールすることにより、アミノオキシ誘導体を

N末端アミノ基特異的に導入するガルトナー (Gaertner) らの方法 (Bioconjugate Chem, 1996, 7, 38-44) などが挙げられる。一般的なトリクロロ-s-トリアジン法 (Trichloro-s-triazine)、カルボキシイミダゾール法 (carboxylimidazole)、スクシンイミジルサクシネート法 (succinimidyl succinate) 等の官能基を導入したリガンドによるLys残基側鎖アミノ基修飾法などへのランダム修飾法によっても導入することができるが、このような方法は選択性が乏しく生理活性蛋白質の活性を阻害する可能性があり好ましい方法ではないのであるが、生理活性蛋白質の生物活性への影響が少なければ本発明の方法に適応することも可能である。

また、糖鎖がリガンドとなる場合には、細胞培養による生産系においてN結合あるいはO結合糖鎖型蛋白質を調製することによりそのままりガンドー蛋白質複合体とすることもできる。この場合には発現された糖鎖型蛋白質の糖鎖をさらに修飾あるいは特定の糖鎖を除去することにより理想的なりガンドとすることも可能である。

一方、低分子薬物あるいはキャリアーへのリガンド導入法としては、修飾可能な薬物やキャリアーの官能基にあわせた修飾法を選択する以外に、その薬理作用を細胞内外で効率よく発揮させるための分解のしやすさ、つまりプロドラッグ的なりガンドのはずれやすさについても考慮する必要がある。このための手段としては、臭化シアン法、過ヨウ素酸酸化法、カルボジイミド法、グルタルアルデヒド法、混合酸無水物法、SPDP試薬法など種々の方法が挙げられる。

本発明のスクリーニング方法を実施するに当たっては、前記した実験例に示されるように個々の速度論的な値を実験により決定してゆき本発明が開示した指標に基づいて最適なりガンドを選択してゆくことができる。しかし、個々の速度論的な値を決定してゆくことは正確で定量的な実験を行わなければならない。本発明の実験方法に則した方法に本発明の方法が限定されるものではない。本発明の精神に反しない限り、より簡便な方法によりリガンドの最適化をおこなうことができることは当業者にはよく理解されるところである。

本発明の開示に基づく本発明のより簡便なより具体的なスクリーニング方法と

しては、例えば、次のような方法を挙げることができる。

細胞膜上に存在する特定のレセプターあるいは抗原等の蛋白質に対する結合親和性を有するリガンド又はリガンドで修飾された物質を、当該レセプターを発現する遊離細胞あるいは培養細胞の存在下でインキュベートした後、細胞表面に結合しているリガンド又はリガンドで修飾された物質を洗浄した後、当該レセプターに対する標識化されたりガンドを添加して細胞内への取り込みを抑えた低温下でインキュベートし、細胞表面への標識化リガンドの結合量が、当該高親和性リガンドそのものの非標識体を初期に添加した場合の結合量に比べて高くなるリガンド又はリガンドで修飾された物質をスクリーニングすることができる。

また、細胞膜上に存在する特定のレセプターあるいは抗原等の蛋白質に対する結合親和性を有するリガンド又はリガンドで修飾された物質を、当該レセプターを発現する遊離細胞あるいは培養細胞の存在下でインキュベートした後、細胞表面に結合しているリガンド又はリガンドで修飾された物質をキレート剤入りのバッファー又は酸性バッファーで洗浄した後、当該レセプターに対する標識化されたりガンドを添加して細胞内への取り込みを抑えた低温下でインキュベートし、細胞表面への標識化されたりガンドの結合量が、レセプター結合後の解離速度定数と内在化速度定数の比が1以上であるリガンドを添加した場合の結合量に比べ高くなるリガンド又はリガンドで修飾された物質をスクリーニングすることができる。

このように、速度論的に絶対的な値を決定することなく、本発明の開示に基づいて相対的な指標から最適なりガンドを選択することができる方法を提供することも本発明に包含されるものである。

このように本発明においては内在化回避能を有するリガンドをスクリーニングする条件 ($k_{off}/k_{int} > 1$) では、出来るだけ k_{off} が大きいもの、即ち結合親和性 ($1/K_d = k_{on}/k_{off}$) が低いものを選択していくことになるのであるが、結合親和性の強さは標的組織に対するターゲティング効率に直接的な相関を有するものであるから、ターゲティング型製剤であるためにはある程度の結合親和性を保持していることが前提となる。具体的には、リガンドあるいはリガンド又は

当該リガンドで修飾された物質のレセプターによる組織や臓器が本来所有する処理能力である固有クリアランス、即ち、 $R_t * k_{int} / K_d$ （ただし、 R_t はレセプター密度を示す。）で表される値が、他の組織や臓器での固有クリアランスより大きくなければならない。

実際、リガンドの速度論パラメーター変化による体内動態シミュレーションを検討してみた。シミュレーションに使用した（Gal）₃リガンドの k_{on} 、 k_{deg} の値をそのままにしておいて、 k_{int} の値を $1/10$ 、 $1/100$ に低下させて固定し、 k_{off} の値を（Gal）₃リガンドの値の 10 倍、 100 倍と変化させた場合の肝細胞外液中のIL-2濃度推移は、いずれも k_{off} の値が 10 倍以上となるとその滞留性が低下した。これは、 k_{off} の値のみに着目してその値を高くすることにより内在化回避能（ k_{off} / k_{int} ）を高く設定しすぎたために、その k_{off} の値から算出される結合親和性（ $1 / K_d$ ）が低くなりすぎて標的に対するターゲティング効率が低下し、他の臓器での固有クリアランスがASGP-Rによる固有クリアランスを超えてしまったためであると考えられる。このシミュレーションの結果からすると、ASGP-Rをターゲットとした場合におけるリガンドの k_{on} が一定であると仮定すると、その k_{off} が 10 倍となった場合の K_d 値（約 3.5 mM）よりも低くなければならないことになり、リガンドが標的に対するターゲティング効率を保持しながら、結合回避能を有する為には、その K_d 値が 10 mM以下、より望ましくは 3.5 mM以下となる結合親和性を有していなければならないということになる。

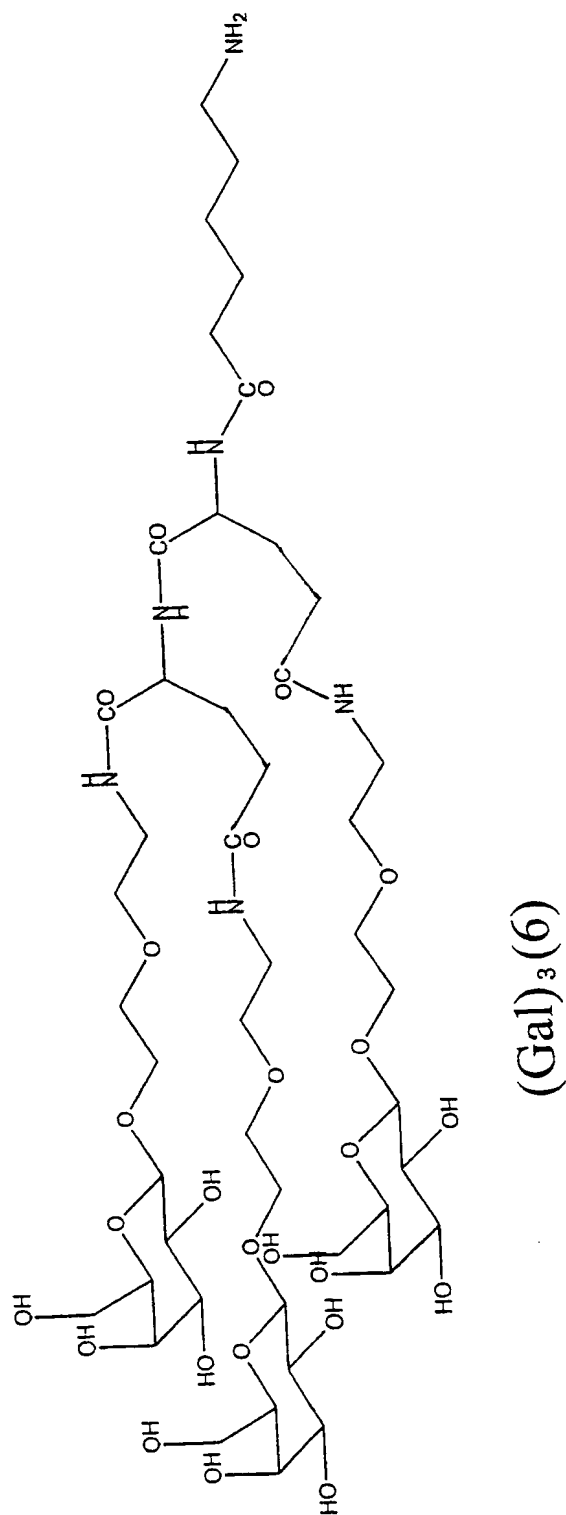
前記した本発明のスクリーニング方法を肝実質細胞のASGP-Rに対する場合を例にしてより具体的に説明する。

まず、 37°C で数分間培養肝細胞と各種リガンド（（Gal）₃を含む）とをインキュベートし、レセプター及び細胞表面への結合画分を氷冷したキレート剤入り又は酸性バッファーで洗浄した後、 4°C にて最も高親和性リガンドである ^{125}I -アシアロオロソムコイド（ASOR）と一定時間インキュベートし、 ^{125}I -ASORの結合量が（Gal）₃を添加したものよりも高いリガンド、即ち（Gal）₃よりも内在化されにくいリガンドをスクリーニングすることができる。なお、

スクリーニングに用いるリガンドは、分枝したガラクトース (Gal)、あるいはN-アセチルガラクトサミン (GalNAc) を有し、肝実質細胞上のASGP-Rに対する解離定数が10 mM以下であるようなある程度の結合親和性を有するものを用いることが好ましい。

例えば、ASGP-Rへの結合親和性がある程度小さいリガンドとするため、2つの一級アミノ基を有する骨格部とラクトースとのNaBH₃CNによる還元アミノ化を行い、骨格部としてはリジン、オルニチン類を用いたりガンドを作製して、前記した本発明のスクリーニング方法を行うことができる。また、グルタミン酸を分枝鎖骨格としてアミド結合により種々の長さのスペーサーを有するGal、又はGalNAcを結合させたりガンドを作製して、前記した本発明のスクリーニング方法を行なうことができる。

前記した方法により、前記した実験で用いた (Gal)₃よりも内在化回避能が高い、次式



(Gal)₃(6)

で表される (Gal)₃(6) リガンドを得た。この (Gal)₃(6) は、前記した (Gal)₃ リガンドのアミド基とガラクトースとの間の 1 個のスペーサー部分の原子数が 5 個、ガラクトースの酵素原子を含めるとスペーサー部分の原子数が 6 個、即ち一般式 (II) 又は (V) における n が 1 の場合、R₆ が -CH₂CH₂- に相当するものである。

また、(Gal)₃(6)、(Gal)₃ リガンドの ASGP-R に対する結合親和性を測定する為、ASOR の培養肝細胞に対する結合阻害実験を行なった結果、(Gal)₃(6) リガンドの結合阻害定数 (K_i)、即ち K_d 値は 0.369 μM と (Gal)₃ リガンドのそれ (0.157 μM) よりも大きく、しかもその値は 10 mM 以下であることがわかった。すなわち、(Gal)₃(6) リガンドは (Gal)₃ リガンドを上回る内在化回避能を有し、その結合親和性もターゲティングが可能な強さに保たれていることが示された。

また、(Gal)₃(6) リガンドによる薬物の肝臓滞留効果を証明する為、(Gal)₃(6) リガンド及び (Gal)₃ リガンド修飾 IFNα ((Gal)₃(6)-IFNα 及び (Gal)₃-IFNα) を調製し、マウス静脈内投与後の肝臓中濃度推移を比較した結果、(Gal)₃(6)-IFNα の 60 分から 120 分までの濃度減少の半減期は (Gal)₃-IFNα の約 2 倍程度長いことがわかった。すなわち、(Gal)₃(6) リガンドはその肝細胞への内在化回避能が高い為に肝臓中でより長時間滞留できることが示された。

一方、前記した相対比較法によるスクリーニング法とは異なり、より定量的に K_d 及び k_{on}、k_{off} を概算することによって適度な結合親和性と内在化回避能を共に有するリガンドをスクリーニングする方法もあり、この方法も本発明の具体例のひとつである。この方法を肝実質細胞の ASGP-R に対する場合を例にして具体的に説明する。

まず、培養肝細胞に対しラベル化した高親和性の ASOR の結合阻害実験を各リガンドについて行い、スキャッチャードプロット解析によりそれぞれの結合阻害定数 (K_i)、即ち結合解離定数 (K_d) を算出し、K_d 値が 10 mM 以下のリガンドを選択する。次に、ラベル化標準リガンドについて R_t (レセプター密度) も算出する。なお、検討する種々のリガンドについてもラベル体を使用する

場合には、通常行われる結合実験により各 K_d 値を算出する。

次に、選択されたりガンド又は当該リガンドで修飾された物質の ^{125}I ラベル体を低温下（ 4°C ）で2時間程度インキュベーションして細胞膜上のレセプターあるいは蛋白質へ結合させた後、冷却した等張性バッファで洗浄して非特異的な結合画分を除く。次に、細胞をエンドサイトーシスによる取り込みによるリガンドの分解が起こらない範囲内の時間、好ましくは10分から30分の範囲内で一定時間、 37°C でインキュベートする。インキュベート後すぐに細胞を 4°C で冷却後、培地をサンプリングする（これを①とする。）。続いて冷却したキレート剤含有または酸性バッファで数回洗浄して特異的な結合画分を細胞から解離させた後（この時を②とする。）、再度冷却して等張性バッファで数回洗浄して非特異的な結合画分をも解離させる。洗浄後の細胞を -80°C で30分程度冷却後、 0.1N NaOH 溶液、あるいは Tween 液など細胞膜溶解剤含有液を添加し、 37°C で2時間程度インキュベートすることにより溶解させた細胞液を得る（これを③とする。）。

上記した①及び③の溶液中のラベル体量を、放射性カウンターあるいは蛍光光度計で測定することにより、細胞外液中への解離量（①）及び細胞内への内在化量（③）を算出する。なお、同時に 37°C でのインキュベート時間0時間での表面結合量（②）を測定する。なお、サンプルリガンドに過剰量（100当量以上）のコールドリガンドを同時添加して同様な取り込み実験を行うことにより、レセプターを介さない画分量を差し引くことがより好ましい。

以上の結果から算出された一定時間経過後の累積解離量（ X_{off} ）、累積内在化量（ X_{int} ）を、表面結合量のAUC（時間ゼロにおける表面結合量と経過時間後の結合量の時間推移下面積（台形法））で割ることにより、 k_{off} 、 k_{int} を算出する。求めた k_{off}/k_{int} が1より大きいものが目的の候補リガンドとなる。

なお、リガンドのラベル化は生理活性蛋白質などの薬物と結合させ、リガンド又は薬物を ^{125}I でラベル化する方法、あるいはリガンドに Tyr を導入して ^{125}I ラベル化させたり、FITCなどで修飾するなどの方法が考えられるが、 k_{off} 、 k_{int} を算出するためには薬物と結合させてラベル化する方法がより好ましい。

本発明のスクリーニング方法におけるリガンド又はリガンドと結合した薬物を標識化する方法としては、前記した ^{125}I のような放射性同位体を用いてもよいが、本発明の方法はこのようなラジオアイソトープによる標識化に限定されるものではなく、FITCやアクリジン誘導体などの蛍光ラベルを使用することもできる。

また、試験に供するリガンド自体をラベル化することなく定量的に k_{int} 、 k_{off} を概算する方法もある。この方法を肝実質細胞のASGP-Rに対する場合を例にして具体的に説明する。

k_{int} の算出は、培養肝細胞に対し、選択されたりガンドを、その K_d 値の50倍以上、好ましくは100倍以上、例えば1000倍にあたる濃度で添加し、エンドサイトーシスによる取り込みによるリガンドの分解が起こらない程度の時間、好ましくは5分から10分程度、37℃でインキュベートする。別途、リガンド無添加の系については0分及び5分から10分程度、37℃でインキュベートする。時間経過後すぐに細胞を4℃に冷却後、冷却したキレート剤含有または酸性バッファーで数回洗浄して特異的な結合画分を細胞から解離させた後、再度冷却した等張性バッファーで洗浄して非特異的な結合画分をも解離させる。冷却した細胞に ^{125}I -ラベルしたASORなどの高親和性リガンドを加え、4℃で、60分程度放置した。冷却した等張性バッファーで洗浄して非特異的な結合画分を解離させた後、細胞を-80℃で30分程度冷却後、0.1N水酸化ナトリウム溶液、あるいはTween液など細胞膜溶解剤含有液を添加し、37℃で2時間程度インキュベートすることにより溶解させた細胞液を得る。この細胞溶解液中のラベル体量を、放射性カウンターで測定することによりエンドサイトーシスにより内在化した以外の表面残存レセプター（リガンド結合 or フリー）量を算出する。リガンド無添加において37℃で0分間インキュベートした表面レセプター量を100として各リガンドの数分間インキュベート後の表面残存レセプター量をそれぞれコントロールに対する比率（%）（% of control）に換算し、数分まで表面レセプター量が一相性に低下していると仮定して次式より、各 k_{int} を算出する。

$$\% \text{ of control} = 100 * \exp(-k_{int} * \text{time})$$

一方、 k_{off} については培養肝細胞に対し、選択されたりガンドをその K_d 値の50倍以上、好ましくは100倍以上、例えば1000倍にあたる濃度で添加し、4℃で60分間程度インキュベートする。別途、リガンド無添加の系についても同様に行なう。冷却した等張バッファーで数回洗浄後、細胞に ^{125}I -ラベルしたASOR等の高親和性リガンドを加え、4℃で、数分及び20分から60分程度（少なくとも2ポイント）インキュベートする。時間経過後すぐに、冷却した等張バッファーで数回洗浄後、-80℃で30分程度冷却後、0.1N水酸化ナトリウム溶液、あるいはTween液など細胞膜溶解剤含有液を添加し、37℃で2時間程度インキュベートすることにより溶解させた細胞液を得る。この細胞溶解液中のラベル体量を、放射性カウンターで測定することによりレセプターヘー度結合したリガンドの解離量をラベル体の結合量として算出する。即ち、リガンド無添加及びリガンド添加系についてそれぞれの数十分インキュベートにおける結合量から数分インキュベートの結合量を差し引いて、経過時間における結合速度（結合量の増加分をその時の経過時間で割ったもの）を算出する。リガンド無添加での結合速度を100として各リガンドの結合速度をそれぞれコントロールに対する比率（%）（% of control）に換算する。各コントロールに対する比率（%）の値をそれぞれ100から差し引き、当該経過時間（t）の間、結合リガンドが一相性に解離し、ラベル体の解離が無視できるレベルであり、解離したリガンドはラベル体の結合に影響しないと仮定して次式より各 k_{off} を算出する。

$$k_{off} = -\ln \{ (100 - (\% \text{ of control})) / 100 \} / t$$

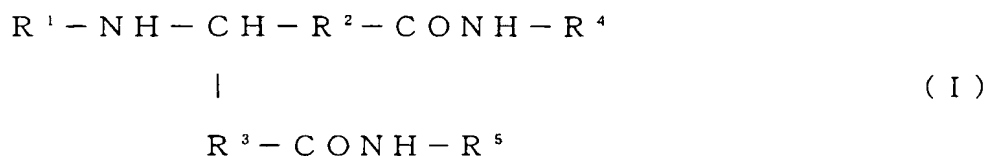
求めた k_{off} 、 k_{int} の値から計算した k_{off}/k_{int} が1より大きいものが目的の候補リガンドとなる。

本発明は、標的組織の細胞の特定のレセプターへの結合を介した内在化回避能と結合親和性とを指標としてリガンドをスクリーニングする方法を提供するものである。そして、本発明は当該スクリーニング方法を実施するための装置及び実施するに必要な試薬を含有してなるスクリーニング用のキットを包含するものである。

本発明のスクリーニング用のキットとして重要なものは、前記の試験においてリガンドとして使用した (G a l) のようなリガンドを標準比較品として含有している試薬キットである。このような標準比較品を使用することにより、本発明のスクリーニング方法をより簡便にかつ短時間で行うことができる。

さらに、本発明は本発明のスクリーニング方法により得られたリガンドを包含するものである。

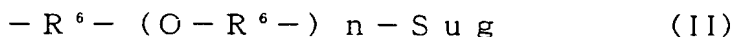
本発明の好ましいリガンドを例を一般式で示すと、次式 (I)、



[式中、 R^1 は水素原子又は生理活性物質に結合し得る官能基を有する有機残基を示し、

R^2 、 R^3 はそれぞれ独立して単結合、又は炭素数 1 ～ 5 の直鎖状又は分枝状のアルキレン基を示し、

R^4 は次式 (II)



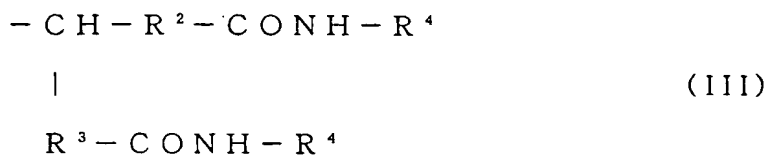
(式中、 R^6 はそれぞれ独立して炭素数 2 ～ 5 の直鎖状又は分枝状のアルキレン基を示し、

Sug 基は糖類基又はその誘導体を示し、

n は 1 ～ 5 の整数である。)

で表される基を示し、

R^5 は前記 R^4 、又は次式 (III)



(式中、 R^2 、 R^3 、及び R^4 はそれぞれ前記した基を示す。)

で表される基を示す。]

で表される化合物が挙げられる。

一般式 (I) 中の R^1 が水素原子の場合には、 R^1-NH- 基がアミノ基となり当該アミノ基により直接生理活性物質と結合させることができる。また、一般式 (I) 中に R^1 が生理活性物質に結合し得る官能基を有する有機残基の場合には、当該有機残基を介して生理活性物質と結合させることができる。

一般式 (I) 中の R^1 における生理活性物質に結合し得る官能基を有する有機残基としては、アミノ基、カルボキシル基、水酸基などの生理活性物質に結合し得る官能基を有する有機基であって、生理活性上不都合を生じさせないものであれば特に制限はないが、好ましくは次式 (VIII)、



(式中、X は生理活性物質に結合し得る官能基を示し、

R^b は X と Y 結合するリンカー基を示し、

Y は単結合、又はカルボニル基を示す。)

で表される基である。式 (VIII) における R^b としては X と Y 結合する生理活性を阻害しない不活性な有機基であり、例えば、鎖状、環状の炭化水素基などがあげられ、より具体的には、直鎖状又は分枝状のアルキレン基、フェニレン基、モノ又はポリ (オキシアルキレン) 基などが挙げられる。直鎖状又は分枝状のアルキレン基としては、炭素数 1 ~ 15 の、好ましくは炭素数 3 ~ 15、より好ましくは 3 ~ 10、さらに好ましくは 3 ~ 7 の直鎖状又は分枝状、好ましくは直鎖状のアルキレン基であり、例えばブチレン基、ペンチレン基、ヘキシレン基などが挙げられる。これらのアルキレン基中の 1 個以上の炭素原子が酸素原子や窒素原子などで置換されていてもよく、またこれらのアルキレン基は場合によっては置換基を有するものであってもよい。

X は生理活性物質、好ましくは生理活性蛋白質に結合させることができる官能基であり、例えばアミノ基、カルボキシル基、水酸基、リン酸基などが挙げられる。Y は一般式 (I) の末端のアミノ基とリンカー基を結合させる基であって、両者を直接結合させる単結合でもよいし、カルボニル基やスルホニル基などのアミノ基誘導体を形成し得る官能基であってもよい。

また、好ましい R^1 としては、



(式中、 R^a は炭素数 1 ～ 15 の直鎖状又は分枝状、好ましくは直鎖状のアルキレン基を示す。)

で表される基が挙げられる。 R^a のアルキレン基は炭素数 1 ～ 15 の、好ましくは炭素数 3 ～ 15、より好ましくは 3 ～ 10、さらに好ましくは 3 ～ 7 の直鎖状又は分枝状、好ましくは直鎖状のアルキレン基であり、例えばブチレン基、ペンチレン基、ヘキシレン基などが挙げられる。

一般式 (I) 中の R^2 、 R^3 におけるアルキレン基としては、炭素数 1 ～ 5、好ましくは 1 ～ 3 の直鎖状又は分枝状、好ましくは直鎖状のアルキレン基であり、例えばメチレン基、エチレン基、プロピレン基などが挙げられる。これらのアルキレン基は場合によっては置換基を有するものであってもよい。一般式 (I) 中の R^2 、 R^3 は隣接するカルボニル基及び炭素原子並びにアミノ基を含めて酸性アミノ酸、例えばグルタミン酸、アスパラギン酸などの化学構造となるものが好ましい。

一般式 (I) 中の R^4 は前記式 (II) で表される基であり、前記式 (II) 中の $-R^6-(O-R^6-)_n-$ 部分は、アミド基とレセプターに対する結合能を有する糖類基との間を形成するスペーサーとなる部分であり、適当な間隔を保持することができる基であればよいが、前記式 (II) で示されるようにアルキレンオキシ基で形成されるのが好ましい。このようなアルキレンオキシ基におけるアルキレン基 (R^6) としては、炭素数 2 ～ 5、好ましくは 2 ～ 3 の直鎖状又は分枝状のアルキレン基などが挙げられる。一般式 (II) における n は 1 ～ 5、好ましくは 1 ～ 3 の整数である。一般式 (II) における Sug 基としては細胞のレセプターに結合し得る基であればよく、糖類基が好ましい。糖類基としてはレセプターに対する結合能を有する糖又はその誘導体であればよい。対象とするレセプターがアシアロレセプターの場合には、糖としてはグルコース又はその誘導体が好ましい。糖の誘導体としては、糖の水酸基がアミノ基に置換されたものや、それらのアシル体などが挙げられる。

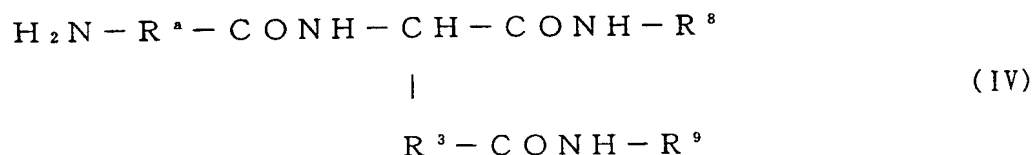
本明細書においてはスペーサー部分 $-R^6-(O-R^6-)_n-$ の原子数に前記

した S u g 基の酸素原子を加えた原子数をリガンドの表記に使用している。例えば、(G a l)₃(6)におけるカッコ内の6は、前記スペーサー部分の原子数が5個で糖類基の酸素原子を加えて6になっていることを示している。

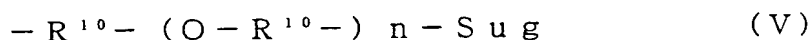
一般式 (I) 中の R⁵は前記 R⁴、又は前記した式 (III) で表されるものが好ましい。R⁵が前記 R⁴である場合は分枝が2個となり、これを本明細書においては「2分枝型」のリガンドと称し、R⁵が前記式 (III) の場合には、リガンド全体の分枝が3個となり、これを本明細書においては「3分枝型」のリガンドと称する。

また、本発明の前記した好ましいリガンドの中には、本発明が初めて提供する新規な化合物が包含されており、したがって、本発明は本発明の好ましいリガンドとして有用な新規な化学物質を提供するものである。

本発明の化合物としては、次式 (IV)、



[式中、R^aは炭素数1～15の直鎖状又は分枝状のアルキレン基を示し、
R³は炭素数1～5の直鎖状又は分枝状のアルキレン基を示し、
R^bは次式 (V)



(式中、R¹⁰はそれぞれ独立して炭素数2～5の直鎖状又は分枝状のアルキレン基を示し、

S u g 基は糖類基又はその誘導体を示し、

nは1～5の整数である。)

で表される基を示し、

R⁹は前記 R⁸、又は次式 (VI)



|

(VI)



(式中、 R^3 は炭素数1～5の直鎖状又は分枝状のアルキレン基を示し、

R^{11} は次式 (VII)



(式中、 R^{10} はそれぞれ独立して炭素数2～5の直鎖状又は分枝状のアルキレン基を示し、

Sug 基は糖類基又はその誘導体を示し、

m は1～5の整数である。ただし、 m は前記式(V)における n とは異なる整数である。)

で表される基を示す。]

で表される化合物が挙げられる。一般式(IV)～(VII)におけるアルキレン基などは前記一般式(I)において説明したものと同様である。

本発明のリガンドはこれをそのまま治療用の医薬組成物の成分として使用することもできるが、通常は当該リガンドを生理活性蛋白質などの薬物を結合させてDDS製剤として使用することができる。

したがって、本発明は本発明のスクリーニング方法により得られたリガンドを含有している生理活性物質及び製薬上許容される担体とからなる医薬組成物をも提供するものである。

本発明の医薬組成物の有効投与量は、使用する薬物としての生理活性物質により適宜調整することができる。本発明の医薬組成物における有効成分の投与量は、生理活性物質をそのまま医薬組成物の成分として使用する従来の医薬組成物に比べてより少量でよい。それは、有効成分を本発明のリガンドで修飾することにより、標的組織により多量に集積し、標的組織の細胞により代謝、分解されることが少ないからである。しかも、標的組織以外の組織においては、薬物の濃度をより低くすることができるので、薬物による副作用も少なくなる。

したがって、本発明の医薬組成物は、従来の製剤化方法では大量投与しなけれ

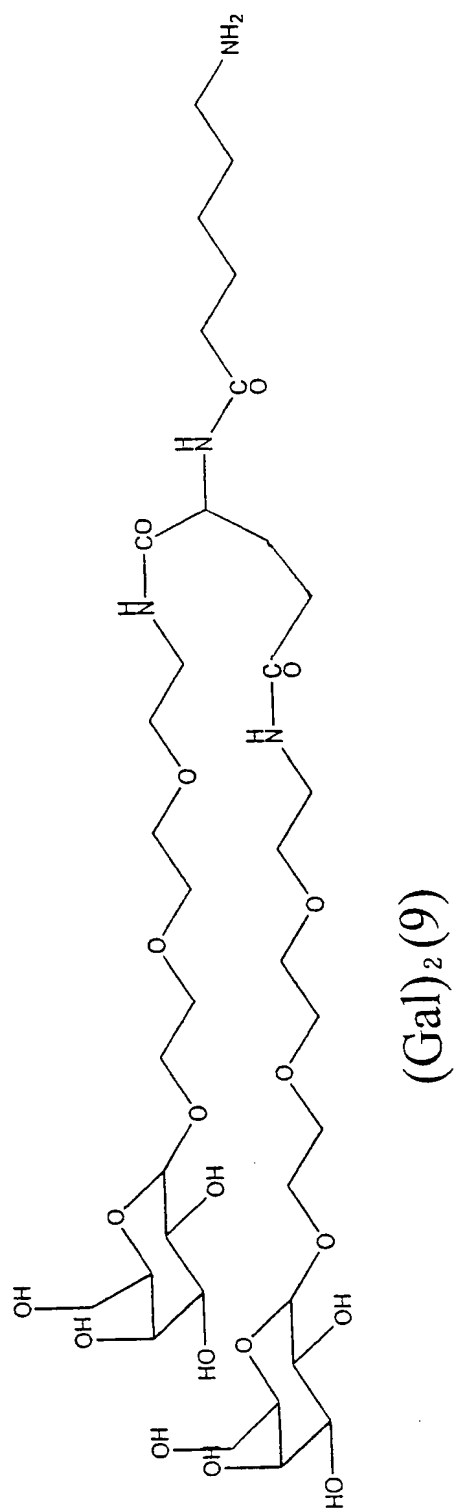
ばならなかった薬物を、極めて少量の投与ですむことになるために、IL-2、IL-6、インターフェロンなどのサイトカイン類をはじめとする生理活性蛋白質を有効成分とする新しい医薬組成物を提供するものであり、これらの有効成分を用いた治療分野を拡大することができるものである。

本発明の医薬組成物の投与方法としては、本発明のリガンドで修飾されていない薬物の投与方法と同様な方法で投与することができ、特定の投与方法に限定されるものではない。

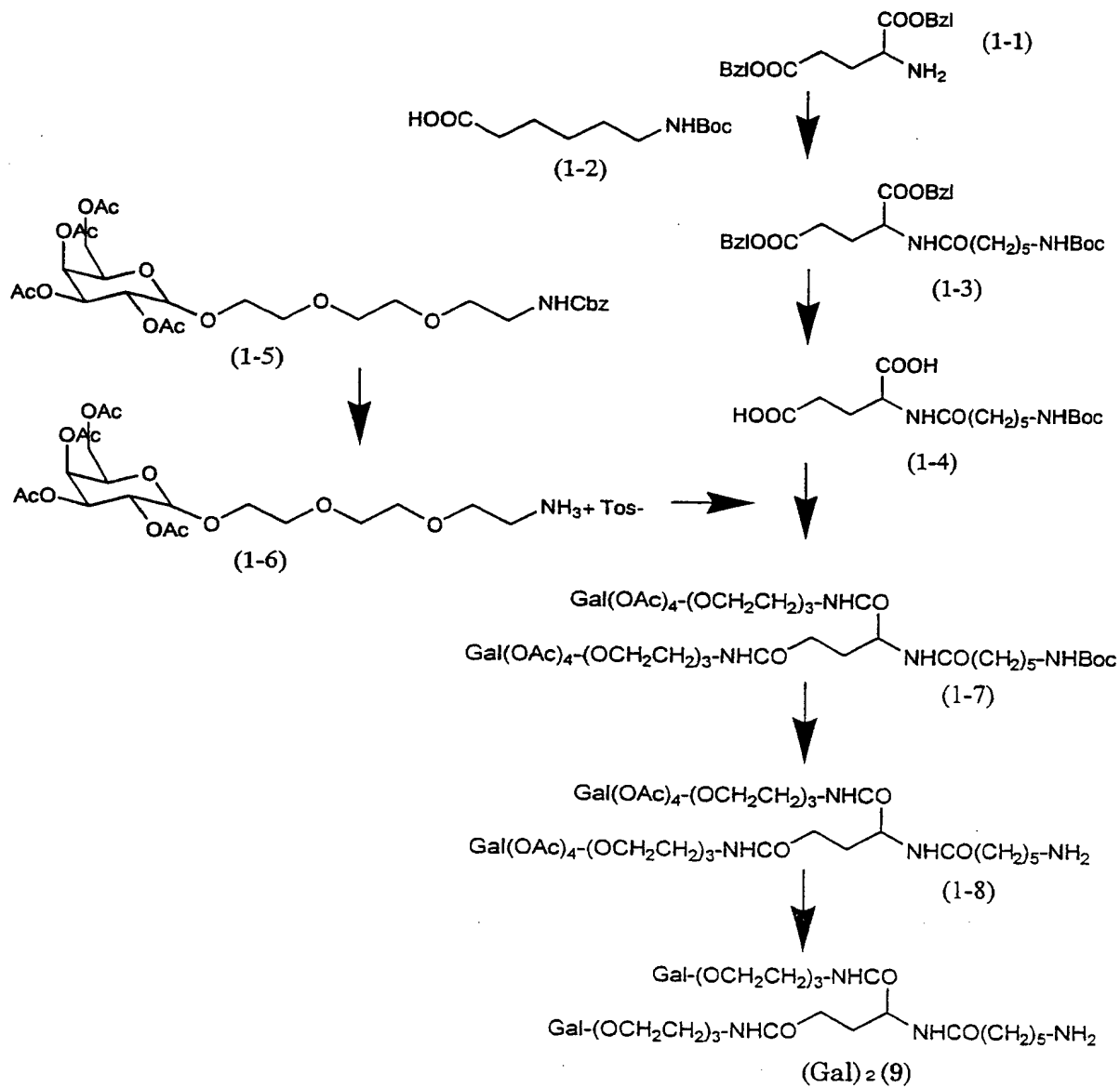
次に実施例により具体的の本発明の方法を説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例 1 (Ga1)₂(9) の製造

(Ga1)₂(9) の構造式を次に示す。

(Gal)₂(9)

(Gal)₂(9) の合成スキームを次に示す。



(1) 化合物 (1-3) の製造

Glu(Obz1)-Obz1·Tos (L-グルタミン酸 α 、 γ -ジベンジルエステルトシル酸塩、化合物 1-1、31.6g) をジメチルホルムアミド (200ml) に溶解し、氷冷し、トリエチルアミン (7.1g)、N-Boc-6-アミノヘキサン酸 (化合物 (1-2、16.1)) を加え、攪拌した。溶解後、氷冷しながら HOBt (1-ヒドロキシベンゾトリアゾールハイドレート、9.42g)、WSC (1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩、13.4g) を順次加え、氷浴中で一晩攪拌した。酢酸エチルで希釈し、10%クエン酸水溶液、水、5%炭酸ナトリウム水溶液、水で準じ洗い、硫酸マグネシウムで乾燥し、濾過し、溶媒をりゅう去して、目的の化合物 (1-3) (35.6g) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) : δ

7.30-7.40(10H, m)、6.18(1H, d, $J=7.5$ Hz)、5.16(2H, s)、5.10(2H, s)、
4.63-4.71(1H, m)、4.5-4.6(1H, br(t))、3.04-3.13(2H, m)、
2.28-2.52(2H, m)、2.20-2.28(1H, m)、2.16(2H, t, $J=7.5$ Hz)、
1.96-2.08(1H, m)、1.56-1.68(2H, m)、1.41-1.50(11H, m)、1.30-1.38(2H, m)

(2) 化合物 (1-4) の製造

化合物 (1-3) (29.5g) をテトラヒドロフラン (950ml) と酢酸エチル (950ml) に溶かし、5%パラジウム-炭素 (27.1g) を加え、水素雰囲気下、一晩攪拌した。濾過し、溶媒をりゅう去して、目的の化合物 (1-4) (18.8g) の固体を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) : δ

6.20-6.32(1H, br)、4.90-5.00(1H, br)、4.55-4.63(2H, m)、
3.04-3.14(2H, m)、2.43-2.56(2H, m)、2.18-2.33(3H, m)、2.02-2.13(1H, m)、
1.58-1.69(2H, m)、1.30-1.52(4H, m)

(3) 化合物 (1-8) の製造

PCT/JP95/00298 (WO96/06181) 記載の方法により合成した化合物 (1-5) (30g) と、p-トルエンスルホン酸 (9.3g) をエタノール (645ml) に溶かし、5%パラジウム-炭素 (9.3g) を加え、水素雰囲気下、一晩攪拌した。触媒を濾過し、溶媒を溜去した。残さをアセトニ

トリルに溶かし共沸後、アセトニトリルを加えN-メチルモルホリンで中和した。これをA溶液とする。

化合物(1-4) (5.2 g) をジメチルホルムアミド(100 ml) に溶かし、N-ヒドロキシスクシンイミド(3.2 g) とジシクロヘキシルカルボジイミド(5.8 g) とを氷冷下加えた後、前記のA溶液(化合物(1-5) の脱Cbz体 15.5 g 分) をゆっくり滴下し、4℃で一晩攪拌した。不溶物をろ別し、残さを酢酸エチルで洗浄後、濃縮し、10%クエン酸水溶液、飽和食塩水、5%炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で準じ洗い、硫酸マグネシウムで乾燥し、濾過し、溶媒を溜去した。残さをシリカゲルクロマトグラフィーにのせ、クロロホルムからクロロホルム:メタノール:アンモニア水=20/1/0.1、そして15/1/0.1に変えて溶出し、化合物(1-7) (4.6 g) を得た。

得られた化合物(1-7) (4 g) を50%トリフルオロ酢酸-ジクロロメタン溶液(30 mL) に溶かし、1時間攪拌し、溶媒を溜去し、エタノールと2回共沸させた。メタノール(24 mL) に溶かし、28%ナトリウムメチラート溶液で中和した後、溶媒をりゅう去することにより、3.0 g の化合物(1-8) 得た。

FAB-MS; $M+Na^+$ 869.4 (MW; 846.9)

(4) (Gal)₂(9) の製造

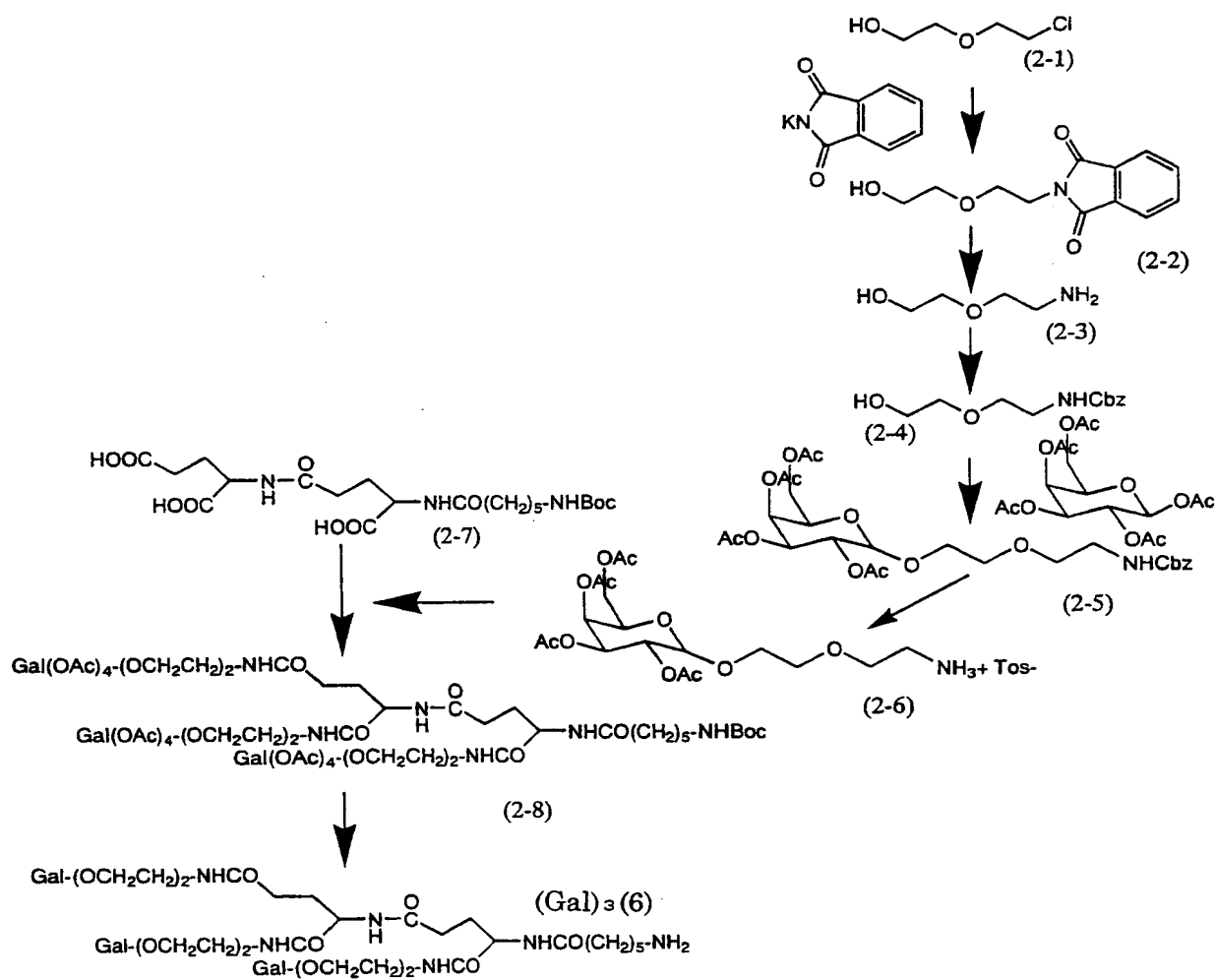
化合物(1-7) (3 g) をメタノール(24 mL) に溶解し、28%ナトリウムメチラート溶液(2.4 mL) を氷冷下に加え、加え終わったら室温に戻して、1時間攪拌した。陽イオン交換樹脂 Dowex 50W-X4 (H⁺、ダウ・ケミカルカンパニー製) で中和し、樹脂を除去し、溶媒をりゅう去した。残さを0.1%トリフルオロ酢酸に溶解させ、イナートシル ODS-2 カラム (GLサイエンス社製) を用いた逆相HPLCにより数回にわたって精製することにより、目的の(Gal)₂(9) (660 mg) を得た。該化合物はイナートシル ODS-2 カラム (GLサイエンス社製) を用いた逆相HPLC分析 (Aバッファー; 0.1%トリフルオロ酢酸、Bバッファー; 0.1%トリフルオロ酢酸、80%アセトニトリル、0分; A 95%、30分; A 75%、リニアグラジエント) によりリテンションタイム19.9分の位置に210 nmに吸収をもつピークが

検出された（純度 95 % 以上）。

ESI-MS ; MH^+ 847.54 (MW 846.9)

実施例 2 (Gal)₃(6) の製造

(Gal)₃(6) の合成スキームを次に示す。



(1) 化合物 (2-2) の製造

2-クロロエトキシエタノール (化合物 (2-1)、120 g) とフタルイミドカリウム (192 g) にジメチルホルムアミド (1 L) を加え、100℃で一晩攪拌した。反応液を冷却後、クロロホルム (300 mL) を加え、濾過した後、ろ液を濃縮して、目的の化合物 (2-2) (255 g) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) : δ

7.59-7.90 (4H, m), 3.83-3.91 (2H, m), 3.57-3.75 (6H, m), 2.75-2.97 (1H, br)

(2) 化合物 (2-3) の製造

化合物 (2-2) (255 g) をエタノール (4.4 L) に溶解し、攪拌しながら 80% ヒドラジン水溶液 (77.9 g) を滴下した。反応液を 2 時間還流後、冷却した反応液を濾過し、溶媒をりゅう去した。残さにジクロロメタン (800 mL) を加え、抽出液を濃縮することにより目的の化合物 (2-3) (120 g) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) : δ

4.40-4.90 (3H, br), 3.30-3.80 (6H, m), 2.70-3.00 (2H, m)

(3) 化合物 (2-4) の製造

化合物 (2-3) (103 g) を水 (1.15 L) に溶かし、攪拌しながら氷冷下、炭酸水素ナトリウム (21.4 g)、トルエン (86 mL) に溶解させたクロロギ酸ベンジル (40.1 g) を 5 回にわたり交互に加え、反応液を室温中、一晩攪拌した。酢酸エチルを加え抽出後、硫酸マグネシウムで乾燥し、濾過し、溶媒をりゅう去した。残さをシリカゲルクロマトグラフィーにのせ、ヘキサン/酢酸エチル = 1/1 から酢酸エチルのみに変えて溶出し、メインフラクションの溶媒をりゅう去することにより化合物 (2-4) (110 g) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) : δ

7.25-7.40 (5H, m), 5.30-5.55 (1H, br), 5.10 (2H, s), 3.60-3.70 (2H, m),

3.45-3.60 (4H, m), 3.25-3.45 (2H, m), 2.60-2.75 (1H, br (t))

(4) 化合物 (2-5) の製造

β -D-ガラクトピラノースペンタアセテート (75 g) と化合物 (2-4) をジクロロメタン (1.5 L) に溶かし、三フッ化ホウ素エーテル錯体塩 (54.5 g) を加え、一晩攪拌した。ジクロロメタンで薄め、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で

洗い、有機相を硫酸マグネシウムで乾燥した。ろ過し、溶媒をりゅう去し、残さをシリカゲルクロマトグラフィーにのせ、ヘキサン/酢酸エチル=1/1で溶出し、メインフラクションの溶媒をりゅう去することにより化合物(2-5)(65g)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) : δ

7.25-7.40(5H, m), 5.35-5.40(1H, m), 5.30-5.35(1H, br),
5.21(1H, dd, $J=8\text{Hz}$, 10Hz), 5.11(2H, s), 5.01(1H, dd, $J=3.2\text{Hz}$, 10.4Hz),
4.54(1H, d), 4.09-4.20(2H, m), 3.85-3.95(2H, m), 3.65-3.75(1H, m),
3.50-3.65(4H, m), 3.35-3.40(2H, m), 2.13(3H, s), 2.04(3H, s),
2.03(3H, s), 1.98(3H, s)

(5) 化合物(2-8)の製造

化合物(2-5)(40g)とp-トルエンスルホン酸(13.4g)をエタノール(860ml)に溶かし、5%パラジウム-炭素(12.4g)を加え、水素雰囲気下、一晚振とうした。触媒を濾過し、溶媒をりゅう去した。残さをアセトニトリルに溶かし2回共沸した後、アセトニトリルを添加し、N-メチルモルホリンで中和した。これをA溶液とする。

PCT/JP95/00298(WO96/06181)記載の方法により合成した化合物(2-7)(4g)をジメチルホルムアミド(20ml)に溶かし、N-ヒドロキシスクシンイミド(2.84g)とジシクロヘキシルカルボジイミド

(5.1g)とを氷冷下加えた後、前記A溶液(化合物(2-7)の16.0g分)をゆっくり滴下し、4℃で一晚攪拌した。不溶物をろ別し、残さを酢酸エチルで洗浄後、反応液を濃縮し、10%クエン酸水溶液、飽和食塩水、5%炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で順次洗い、硫酸マグネシウムで乾燥し、濾過し、溶媒をりゅう去した。残さをシリカゲルクロマトグラフィーにのせ、クロロホルムからクロロホルム/メタノール/アンモニア水=25/1/0.1、20/1/0.1、そして15/1/0.1に変えて溶出し、メインフラクションの溶媒をりゅう去することにより化合物(2-8)(3.2g)を得た。

ESI-MS; MH^+ 1741.6 (MW 1741.8)

(6) (Gal)₃(6)の製造

化合物 (2-8) (3 g) を 50%トリフルオロ酢酸-ジクロロメタン溶液 (15 ml) に溶かし、1時間攪拌し、溶媒をりゅう去し、エタノールと2回共沸させた。メタノール (12 ml) に溶かし、28%ナトリウムメチラート溶液で中和した後、該28%ナトリウムメチラート溶液 (1.2 mL) を氷冷下に加え、加え終わったら室温に戻して、1時間攪拌した。陽イオン交換樹脂 Dowex 50W-X4 (H^+ 、ダウ・ケミカルカンパニー製) で中和し、樹脂を除去し、溶媒をりゅう去した。残さを0.1%トリフルオロ酢酸に溶解させ、イナートシル ODS-2 カラム (GLサイエンス社製) を用いた逆相 HPLC により数回にわたって精製することにより、化合物 (2-9) (660 mg) を得た。該化合物はイナートシル ODS-2 カラム (GLサイエンス社製) を用いた逆相 HPLC 分析 (A バッファー; 0.1%トリフルオロ酢酸、B バッファー; 0.1%トリフルオロ酢酸、80%アセトニトリル、0分; A 95%、30分; A 75%、リニアグラジエント) によりリテンションタイム 17.4 分に 210 nm に吸収を持つピークが検出された (純度 95%以上)。

ESI-MS; MH^+ 1137.7 (MW 1137.2)

実施例 3 ((Gal)₃-IL-2 の調製)

(Gal)₃-IL-2 の調製及び単離精製は、PCT/J P 97/01915 と同様な方法により行なった。この結果、SDS-PAGE による分析により 1 バンドとなる純度の高い検体 (1.52 mg、回収率 15.2%) が得られた。Gillis らの方法 (J. Immunol., 120, 2027, (1978)) により測定した (Gal)₃-IL-2 の IL-2 生物活性は 9.21×10^6 unit/mg (未修飾 IL-2 に対する比活性は 107%) であり、その IL-2 の生物活性を保持していることが示された。

実施例 4 ((GalNAc)₃-IL-2 の調製)

(GalNAc)₃-IL-2 の調製及び単離精製は、PCT/J P 97/01915 と同様な方法により行なった。この結果、SDS-PAGE による分析により 1 バンドとなる純度の高い検体 1.51 mg (回収率 20%) が得られた。

Gillisらの方法 (J. Immunol., 120, 2027, (1978)) により測定した (GalNAc)₃-IL-2 の IL-2 生物活性は 8.45×10^6 unit/mg (未修飾 IL-2 に対する比活性は 98%) であり、その IL-2 の生物活性を保持していることが示された。

実施例 5 ((Gal)₃-IFN α の調製)

(Gal)₃-IFN α の調製及び単離精製は、PCT/JP97/01915 と同様な方法により行なった。この結果、SDS-PAGE による分析により 1 バンドとなる純度の高い検体 31.3 μ g (回収率 31%) が得られた。渡部らの方法 (Lymphokines and Interferones; A Practical Approach, IRL Press, Oxford, 1987) により測定した (Gal)₃-IFN α の IFN α 生物活性は 1.93×10^8 IU/mg (未修飾 IFN α に対する比活性は 104%) であり、その IFN α の生物活性を保持していることが示された。

調製した (Gal)₃-IFN α 及び未修飾 IFN α を辻らの方法 (Biochemistry, (1987), 26, 3129-3134) に従い還元カルボキシメチル化後、トリプシン処理し、反応液の LC/MS によるペプチドマップを比較した結果、(Gal)₃-IFN α において Gln102 を含むアミノ酸配列由来のピークのみが観察された。この結果、(Gal)₃ は微生物起源トランスグルタミナーゼにより IFN α (ヒト IFN α -2b) の Gln102 に位置選択的に結合していることを確認した。

実施例 6 ((Gal)₃(6)-IFN α の調製)

(Gal)₃(6)-IFN α の調製及び単離精製は、PCT/JP97/01915 と同様な方法により行なった。この結果、SDS-PAGE による分析により 1 バンドとなる純度の高い検体 68.5 μ g (回収率 34%) が得られた。

実施例 7 ((Gal)₂(9)-IFN α の調製)

(Gal)₂(9)-IFN α の調製及び単離精製は、PCT/JP97/01915 と同様な方法により行なった。この結果、SDS-PAGE による分析に

より 1 バンドとなる 純度の高い検体 58. 2 μ g (回収率 29%) が得られた。

実施例 8 結合阻害実験

各リガンドによる ASOR のマウス肝細胞への結合阻害実験を、Biessen らの方法 (Biessen EAL et al., J. Biol. Chem, 271 (45): 28024-28030 (1996)) に準じて行った。

2% BSA を含む D-PBS に肝実質細胞 (4 mL のファルコンチューブ (Falcon tube) 中に 0.6 ~ 1.0 $\times 10^6$ / 0.5 mL、氷浴中) を取り、それに 2% BSA を含む D-PBS で種々の濃度にした阻害剤 0.25 mL を加えた。これに、2% BSA を含む D-PBS 中の 125 I-ASOR 0.25 mL (22 nM) を加え、4℃で2時間ゆっくり攪拌した。

50 G で1分間遠心分離し、上澄みを捨て、2% BSA を含む D-PBS を加えて攪拌した後、再度 50 G で1分間遠心分離し、上澄みを捨てた。これをもう一度繰り返した後、 γ カウンターで測定した。

その後、これに 10% SDS を含む 0.1 N NaOH を 1 mL 加えて蛋白質濃度を蛋白質アッセイキット (バイオラッド (BioRad) 社製) を用いてロウリー (Lowry) 法により測定した。

さらに、ASOR のマウス分離肝細胞への結合に対する、2 種のリガンドの結合阻害実験を上述の方法に準じて行った。

その結果、(GalNAc)₃、(Gal)₃ 共に添加濃度の上昇に伴い、 125 I-ASOR がほぼ一相性で解離した。計 3 回の解離データをそれぞれ非線形のシングルサイトモデル (single site model) を用いて解析し、結合阻害定数 (K_i) を算出した。結果を前記した表 1 に示す。

2 種のリガンドの阻害能には大きな違いが見られた。(GalNAc)₃ の K_i 値は ASOR のその約 230 倍 (1.7 μ M) であったのに対し、(Gal)₃ のそれは約 50000 倍 (350 μ M) であった。なお、結合阻害定数 (K_i) は結合解離定数 (K_d) と考えられるため、これらの結果から各リガンドの K_d 値が算出された。

実施例 9 結合阻害実験 2

実施例 8で行なった B i s s e n 等の方法による結合阻害実験において、添加した ^{125}I -A S O R の濃度は 22 nM であった。A S O R の K_d 値は数 nM 程度であり、添加した A S O R の濃度は実際の K_d 値よりも高いために、実施例 8 では各リガンドによる結合阻害がかかりにくく、その K_i 値も高く見積もられてしまう。新たに合成したリガンド ($(\text{G a l})_3(6)$ 、 $(\text{G a l})_2(9)$) の評価を行なうにはより正確な K_i 値を算出する必要がある為、添加する ^{125}I -A S O R の濃度をその K_d 値より十分に低くし、さらに実験条件を改良して再度結合阻害実験を行なった。

実施例に示す B e r r y 等のコラゲナーゼ還流法により単離し、12well プレート上で一晚培養したマウス初代培養肝細胞を、D-PBS、0.1% BSA 及び 20 mM H e p e s を含む D-MEM (pH 7.4) (各 2 mL) で 2 回ずつ洗浄後、該 D-MEM 培地 (1 mL) を加え、37℃で 60 分、ブレインキュベートした。細胞に冷却した 10 mM の E D T A を含む D-PBS (pH 5.0) を添加し、氷冷下 4 分間放置後、冷却した D-PBS (2 mL) で 2 回洗浄した。氷浴上にプレートのをせ、各 well 中の細胞に 0.6 nM の ^{125}I -A S O R と種々の濃度に設定した該 D-MEM 培地中の各コールドリガンドとを同時に含む 0.4 mL を加え、4℃で、60 分放置した。氷浴上、冷却した D-PBS (1 mL) で 4 回洗浄、-80℃で 30 分以上放置後、0.1 N 水酸化ナトリウム (0.5 mL) を加え、37℃で 1 時間以上インキュベートし、細胞溶解液を γ カウンターにて測定することにより細胞表面に結合した ^{125}I -A S O R 量を算出した。

各リガンドは添加濃度の上昇に伴い、 ^{125}I -A S O R がほぼ一相性で解離した。計 2 回 ($(\text{G a l N A c})_3$ については計 1 回) の低温下結合阻害曲線より、レセプターが 1 サイトで、レセプター以外に A S O R がリガンドによる結合阻害を受けない部分を仮定したモデルでの F i t t i n g を行なった。その結果、 $(\text{G a l N A c})_3$ 、 $(\text{G a l})_3$ 、 $(\text{G a l})_3(6)$ 、 $(\text{G a l})_2(9)$ の K_i 値はそれぞれ、0.00333 μM 、0.157 μM 、0.369 μM 、1.05 μM となった。この結果、新たに合成したリガンドのアシアロ糖タンパク質レセプ

ターに対する結合親和性は、 $(Gal)_3$ リガンドのその数分の1程度であることが示された。しかし、各 K_d 値は10 mMよりも低いことから理論上、アシアロ糖タンパク質レセプターに対するターゲティング効率は保持されていることが予想された。

実施例 10 薬物の抗腫瘍効果

6週齢のB10D2系雌マウス（1群7匹、7群の計49匹）にS908系の腫瘍細胞 7.5×10^4 個を移植して腫瘍を発生させた。腫瘍細胞移植後7日目から5日間、1日2回計10回薬物を投与した。第1群目はコントロールとして生理食塩水を投与し、第2群目にはIL-2を1回当たり 1.0×10^4 単位（150 μ l）を投与（低用量群）し、第3群目にはIL-2を1回当たり 4.0×10^4 単位（150 μ l）を投与（高用量群）し、第4群目には $(Gal)_3$ -IL-2を1回当たり 1.0×10^4 単位（150 μ l）を投与（低用量群）し、第5群目には $(Gal)_3$ -IL-2を1回当たり 4.0×10^4 単位（150 μ l）を投与（高用量群）し、第6群目には $(GalNAc)_3$ -IL-2を1回当たり 1.0×10^4 単位（150 μ l）を投与（低用量群）し、第7群目には $(Gal)_3$ -IL-2を1回当たり 4.0×10^4 単位（150 μ l）を投与（高用量群）した。

腫瘍細胞を移植してから28日目に解剖して腫瘍の治癒、大きさなどを調べた。

薬効の統計解析は多重検定法により行なった。抗腫瘍効果については、1パラメーターANOVA（Dunnett's-t-test）、治癒例数及び死亡例数については、Fisher's protected LSDにて行なった。結果を前掲した表2に示す。

抗腫瘍効果については、 $(Gal)_3$ -IL-2群は高用量、低用量ともに対象群に対し有意な効果を認めた。これに対しIL-2群では高用量においてのみ対象群に対し有意な効果が認められ、 $(GalNAc)_3$ -IL-2群では2用量とも有意差が認められなかった。治癒例数については、 $(Gal)_3$ -IL-2群においてのみ高用量、低用量ともに対象群、IL-2群、及び $(GalNAc)_3$ -IL-2群に対し有意な効果を認めた。死亡例数については低投与量においてのみ $(Gal)_3$ -IL-2群、IL-2群、及び $(GalNAc)_3$ -IL-2群

がいずれも対象群に対し有意な効果を認めた。以上の結果を総合すると、3検体の抗腫瘍効果は $(\text{Gal})_3\text{-IL-2} > \text{IL-2} > (\text{GalNAc})_3\text{-IL-2}$ の順に強い傾向にあることが示された。

実施例 1 1 リガンド修飾 IL-2 の体内動態

6週齢の雄マウス (C57BL/6、CRJ社) にクロラミンT法により ^{125}I でラベルした $(\text{Gal})_3\text{-IL-2}$ ($6.9 \times 10^6 \text{ cpm}/\mu\text{g}$) 及び $(\text{GalNAc})_3\text{-IL-2}$ ($2.0 \times 10^6 \text{ cpm}/\mu\text{g}$) を IL-2 換算で $50 \mu\text{g}/\text{kg}$ 尾静脈投与し、一定時間 (20秒、40秒、60秒、90秒、120秒、180秒) 経過後、採血及び主要臓器 (心臓、肝臓、腎臓、肺、脾臓、胃、小腸、大腸、筋肉) の採取を行なった。血漿は採取後、10000rpmで3分間遠心分離することにより得た。検体の各組織中濃度は、血漿についてはTCAによる沈殿画分を、各臓器についてはそのままのものをγカウンターにて測定することにより求めた。

$(\text{Gal})_3\text{-IL-2}$ 、及び $(\text{GalNAc})_3\text{-IL-2}$ の ^{125}I -標識体静注体内動態検討後の主要臓器の取り込みクリアランス (3分の取り込み量/3分までのAUC) とKp値 (3分の取り込み量/3分での血漿中濃度) を、それぞれ第14図及び第15図に示す。

この結果、 $(\text{Gal})_3\text{-IL-2}$ 、 $(\text{GalNAc})_3\text{-IL-2}$ ともに体重1kg当たりにおける肝取り込みクリアランス (CLuptakeLi)、肝Kp (Kpliver) が他の臓器のそれに比べ高く、どちらのリガンドについても全身消失並びに分解を決めている主な臓器は肝臓であることがわかった。

両者の臓器1g当たりのCLuptakeLi ($\text{ml}/\text{min}/\text{g}$ 肝臓) は $(\text{Gal})_3\text{-IL-2}$ が0.34、 $(\text{GalNAc})_3\text{-IL-2}$ が0.50と違いが見られ、インビボにおいて $(\text{GalNAc})_3\text{-IL-2}$ の方が $(\text{Gal})_3\text{-IL-2}$ に比べ取り込み効率が約1.5倍高いことが示された。

実施例 1 3 (マウス肝細胞の分離及び培養)

肝実質細胞の分離は、Berryらの方法 (Berry M.N. et al., J. Cell. Biol. 43:

506-520 (1969)) を改良して行なった。即ち、6～10週齢の雄マウス (C57BL/6, CRJ社) のコラゲナーゼ還流後の細胞分散液を、濾過、遠心後、ブレーティングせずにファルコンチューブ中、4℃で放置した。同様に処理したマウス2～3匹分の細胞懸濁液を合わせた後、50G×1分間で3～4回遠心分離を行うことにより、バイアビリティ (Viability) が90%以上であるマウス肝実質細胞を $6.0 \times 10^7 \sim 1.1 \times 10^8$ 個得た。

細胞をストレプトマイシン ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$)、ペニシリン ($100 \text{U}/\text{ml}$)、Hepes (20mM)、及びFBS (10%, Cat.No. 26140-0791、ギブコ (Gibco) 社製) を含有したD-MEM (Cat.No. 31600-091, Gibco社製) 培地 (pH 7.4) に懸濁後 ($3.0 \times 10^5/\text{ml}$)、12ウエルのコラゲナーゼコートマイクロプレート (Code.No. 4815-010、イワキ (IWAKI) 社製) に1mlずつ添加し、37℃、5% CO₂中で一晩培養して取り込み実験に用いた。

実施例 14 (パルスチェイス法によるマウス肝細胞への取り込み実験)

パルス追跡法によるマウス肝細胞への取り込み実験は、桑原らの方法 (Kuwabara T., et al., Am. J. Physiology 193: 73-84 (1996)) を参考にして行なった。

¹²⁵I-ラベル体は前記した実施例 11において用いたものと同様のサンプルを使用した。

実施例 12で得られたマウス肝細胞を12ウエルのプレートに取り、これに1mlのD-PBS (pH 7.4) を加えて4℃でインキュベートした後、D-PBSで2回洗浄した。これを、0.1% BSA及び25mM Hepes (pH 7.4) を含有する氷冷したD-MEM 0.5mlで2回洗浄した。

これに、200μlの氷冷した¹²⁵I-(Gal)₃-IL-2又は(GalNAc)₃-IL-2 (IL-2として0.65μg/ml; 42nM) の0.1% BSA及び25mM Hepes (pH 7.4) を含有するD-MEM溶液を加えた。さらに、200μlの氷冷した0.1% BSA及び25mM Hepes (pH 7.4) を含有するD-MEMを、200mMのGalNAcの存在下又は非存在下に加えた。これらを4℃で2時間放置した。

放置後、0.1% BSA及び25mM Hepes (pH 7.4) を含有する

500 μ l の氷冷した D-MEM で 4 回洗浄した。0.1% BSA 及び 25 mM HEPES (pH 7.4) を含有する 500 μ l の D-MEM を加えて 37℃ にし、37℃ で、それぞれ 0 分、1 分、2 分、3.5 分、5 分、7 分、10 分、20 分、又は 30 分間保った後、直ちに氷浴で 4℃ に冷却した。得られた溶液を各々 2 つに分け、そのひとつを次のように処理した。

そのひとつを 150 μ l づつさらに分け、ひとつの 150 μ l について 125 I の量を定量した。この定量値を⑥とした。

他の 150 μ l については、これに 150 μ l の 20% TCA を加え、4℃ で 10 分間放置した後、3500 rpm で 10 分間遠心分離して沈澱物を分離した。溶液の 125 I の量を定量した。この定量値を⑦とした。

氷浴で 4℃ に冷却したときの残りの溶液のほうは、これを 0.1% BSA 及び 25 mM HEPES (pH 7.4) を含有する 500 μ l の氷冷した D-MEM で 2 回洗浄した後、氷冷した 1 ml の D-PBS (pH 7.4) を加え、4℃ で 10 分間放置し、20 mM EGTA (pH 7.4) を含有した氷冷した D-PBS を 1 ml 加え 4℃ で 10 分間放置した。このときの 125 I の量を定量し、この定量値を②とした。

さらに、氷冷した 1 ml の D-PBS (pH 7.4) を加え、このときの 125 I の量を定量し、この定量値を③とした。

次いで、-80℃ で 30 分以上放置し、これに 0.5 ml の 0.1 N-NaOH を加え、37℃ で 2 時間放置した後、このときの 125 I の量を定量し、この定量値を④とした。

さらに、0.25 ml の 0.1 N-NaOH を加え、洗浄した後、このときの 125 I の量を定量し、この定量値を⑤とした。

以上の定量値から各値を次の式により算出した。

$$[\text{内在化された物質の量}] = \text{④} + \text{⑤}$$

$$[\text{解離された物質の量}] = (\text{⑥} - \text{⑦} * 2) * 500 / 150$$

$$[\text{分解された物質の量}] = \text{⑦} * 500 / 150$$

$$[\text{細胞表面に結合している物質の量}] = \text{②} + \text{③}$$

なお細胞中の総蛋白質量は、取り込み実験に用いない一晚培養後のプレート中

の 3 w e l l についてそれぞれロウリー (Lowry) 法 (バイオラッド (Bio Rad) 社製) により定量し、平均値を算出した。

この試験において用いる微分式は次のとおりである。

$$d L R s / d t = k_{o n} R t * L - (k_{o f f} + k_{i n t}) * L R s$$

$$d L R i / d t = k_{i n t} * L R s - k_{d e g} * L R i$$

$$d X_{d e g} / d t = k_{d e g} * L R$$

実験は、トレーサーとしてラベル体を用いて行なったのでレセプター数 (R) は一定とした。また、リガンド-IL-2ハイブリッド体の媒体中濃度 (L) の減少はわずかであったので、 L は一定とした。計 3 回の実験を行ない、1 回毎 ($n = 3$) に解析して速度論的パラメーターを算出した。

即ち、得られたラジオアクティビティー (Radioactivity) 量は全て添加液濃度 ($c p m / \mu l$) 及び各実験毎に定量した 1 ウエル中の総蛋白質量 ($m g /$ ウエル) で割ることにより、分布容積 ($\mu l / m g$ 細胞蛋白質) に換算した。なお添加液濃度は各実験毎に T C A 沈殿法により算出したインタクト ($I n t a c t$) な割合を掛けて補正した。データはすべて G a l N A c 無添加の値から G a l N A c 添加の値を差し引くことにより A S G P-R を介した特異的な取り込み由来のものとし、各時間における細胞表面への結合量 ($B i n d$)、取り込み量 ($I n t e r$)、分解量 ($D e g$)、解離量 ($D i s$) を平均値として算出した。次に結合の A U C₀₋₁ ($\mu l * m i n / m g$) に対する取り込み ($\mu l / m g$) 及び分解 ($\mu l / m g$) の積分プロットについて、非線形最小自乗法 (M u l t i、重み 2) (K. Yamaoka, et al., J. Pharmacobio-Dyn. 4: 879-885 (1981)) による最適化を行ない内在化及び解離速度定数 ($k_{i n t}$ 、 $k_{o f f}$; $m i n^{-1}$) をそれぞれ求めた。

実施例 15 連続インキュベーション法によるマウス肝細胞への取り込み実験

実施例 13 で得られたマウス肝細胞を 12 ウエルのプレートに取り、これに 1 m l の D-P B S (p H 7.4) を加えて 4℃ でインキュベートした後、D-P B S で 2 回洗浄した。

これに、200 μl の氷冷した ^{125}I - (G a l) ₃-IL-2 又は (G a l N

Ac)₃-IL-2 (IL-2として0.65 μg/ml; 42 nM) の0.1% BSA及び25 mM HEPES (pH 7.4) を含有するD-MEM溶液を加えた。さらに、200 μlの氷冷した0.1% BSA及び25 mM HEPES (pH 7.4) を含有するD-MEMを、200 mMのGalNAcの存在下又は非存在下に加えた。

これを、37℃で、それぞれ1分、5分、10分、20分、30分、60分、120分、又は240分間保った後、直ちに氷浴で4℃に冷却した。得られた溶液を各々2つに分け、そのひとつを次のように処理した。

そのひとつを150 μlづつのさらに分け、ひとつの150 μlについて¹²⁵Iの量を定量した。この定量値を⑥とした。

他の150 μlについては、これに150 μlの20% TCAを加え、4℃で10分間放置した後、3500 rpmで10分間遠心分離して沈澱物を分離した。溶液の¹²⁵Iの量を定量した。この定量値を⑦とした。

氷浴で4℃に冷却したときの残りの溶液のほうは、これに1 mlの氷冷したD-PBS (pH 7.4) を加え、4℃で10分間放置し、20 mM EGTA (pH 7.4) を含有した氷冷したD-PBSを1 ml加え4℃で10分間放置した。このときの¹²⁵Iの量を定量し、この定量値を②とした。

さらに、氷冷した1 mlのD-PBS (pH 7.4) を加え、このときの¹²⁵Iの量を定量し、この定量値を③とした。

次いで、-80℃で30分以上放置し、これに0.5 mlの0.1 N-NaOHを加え、37℃で2時間放置した後、このときの¹²⁵Iの量を定量し、この定量値を④とした。

さらに、0.25 mlの0.1 N-NaOHを加え、洗浄した後、このときの¹²⁵Iの量を定量し、この定量値を⑤とした。

以上の定量値から各値を次の式により算出した。

$$[\text{内在化された物質の量}] = \text{④} + \text{⑤}$$

$$[\text{分解された物質の量}] = \text{⑦} * 500 / 150$$

$$[\text{細胞表面に結合している物質の量}] = \text{②} + \text{③}$$

なお細胞中の総蛋白質量は、取り込み実験に用いない一晩培養後のプレート中

の 3 w e l l についてそれぞれロウリー (Lowry) 法 (バイオラッド (Bio Rad) 社製) により定量し、平均値を算出した。

合計 3 回の実験を行なった連続インキュベーション法によるデータの解析は、1 回毎 ($n = 3$) のデータについて解析し、速度論的パラメーターを算出した。

得られたラジオアクティビティー (Radioactivity) 量は前記の実施例 4 と同様に全て添加液濃度 ($\text{cpm}/\mu\text{l}$) 及び各実験毎に定量した 1 ウエル中の総蛋白質量 ($\text{mg}/\text{ウエル}$) で割ることにより、分布容積 ($\mu\text{l}/\text{mg}$ 細胞蛋白質) に換算した。なお、添加液濃度は各実験毎に T C A 沈殿法により算出したインタクト (Intact) な割合を掛けて補正した。データはすべて G a l N A c 無添加の値から G a l N A c 添加の値を差し引くことにより A S G P - R を介した特異的な取り込み由来のものとし、各時間における細胞表面への結合量 (Bind)、取り込み量 (Inter)、分解量 (Deg) を平均値として算出した。得られたデータについて N a p p (Numeric Analysis Program for Pharmacokinetics) (H. Hisaka & Y. Sugiyama, J. Pharmacokine. Biopharm., (1999), 26, in press) を用いた最適化を行なった。最適化は前記の実施例 4 で得られた K_{int} と K_{off} の比を (G a l) γ - I L - 2 及び (G a l N A c) γ - I L - 2 についてそれぞれ固定し、非線形最小自乗法にルング・クッタ・ギル (Runge Kutta Gill) 法を組み合わせることにより行ない、 K_{int} (min^{-1})、 K_{off} (min^{-1})、 K_{deg} (解離速度定数、 min^{-1})、及び $K_{on} R t$ (結合クリアランス; $K_{on} * R t$, $\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg}$) を算出した。

実施例 16 薬物動態のシュミレーション

(G a l) γ - I L - 2、(G a l N A c) γ - I L - 2 及び I L - 2 の薬効の違いを説明する為、生理学的な知見に基づいた薬物動態モデルを構築した。

このシュミレーションで使用したパラメーターは前記の実施例 4 及び 5 の実験で得られた薬物動態及び速度論パラメータ並びに生理学的パラメータを用いた。リガンド修飾 I L - 2 はともに主要な分布並びに消失臓器が肝臓であるため、肝細胞外液と血液循環系からなる単純なコンパートメントの生理学的な薬物動態モデルとした。これをもとに S t e l l a (Bogen et al., Science, 246: 138-14

2 (1989)) を用いてシュミレーションを行い、体内動態の予測計算を行なった。

IL-2 については実験的に観察された肝臓における非特異的な消失クリアランスをモデルに加え、ASGP-R への結合クリアランスを 0 とした。なお、各画分中のリガンド-IL-2 ハイブリッド体濃度に関する速度式を下記に示す。

(血漿中画分)

$$dC_b/dt = (-Q_H * C_b + Q_H * C_e) / V_b$$

(肝細胞外液中画分)

$$dC_e/dt = (Q_H * C_b - k_{on}RT * C_e * F + k_{off} * X_s - Q_H * C_e) / V_e$$

(肝細胞表面結合画分)

$$dX_s/dt = k_{on}P_t * C_e * F - (k_{off} + k_{int}) * X_s$$

(肝細胞内画分)

$$dX_i/dt = k_{int} * X_s - k_{deg} * X_i$$

(分解画分)

$$dX_{deg}/dt = k_{deg} * X_i$$

(レセプター占有率)

$$\text{Receptor Occupancy} = C_e / (K_d + C_e)$$

前記した表 3 に記載の使用したパラメーターのうち、(a) については (Gal)₃-IL-2 の取り込み実験データから得られた値を、(b) の肝臓以外の臓器による取り込みクリアランスについては体内動態実験で得られた (Gal)₃-IL-2 の腎取り込みクリアランスの値を用いた。(c) の IL-2 についてのみの肝クリアランス (CL_{NSP}) は、実施例 13 で得られた IL-2 の非特異的な取り込みによる分解速度と (Gal)₃-IL-2 の分解速度との比がそれぞれの肝固有クリアランスの比に等しいとおいて計算した。ここで (Gal)₃-IL-2 の固有クリアランスは、

$$CL_{int\ h} (Gal) = \frac{F * k_{on}RT (Gal) * k_{int} (Gal)}{(k_{off} (Gal) + k_{int} (Gal))}$$

にて表される (CL_{int h}; 肝固有クリアランス、F; 換算定数)。

また、使用したパラメーターのうち肝細胞外容積 V_e は、その容積が臓器重量

の約20%であるという宮内らの報告 (S. Miyauchi, et al., J. Pharmacokin. Biopharm. 15: 25-38 (1987)) より算出した。

Q_H (肝血漿流速) 及び F (インビトロで得られた $k_{on}Rt$ (結合クリアランス) のインボボモデルへの換算定数) は、以下のようにして求めた。

即ち、 ^{125}I 標識体静注後の体内動態検討により得られた $(Gal)_3-IL-2$ 、 $(Gal)NAc)_3-IL-2$ それぞれの肝取り込みクリアランス $CL_{uptakeLi}$ は投与初期での肝臓への分布を測定している為、インビトロの実験で算出した結合クリアランス ($k_{on}Rt$) を主に反映していると考えられる。肝取り込みに関する固有クリアランス ($CL_{int, uptake}$) は、 $CL_{int, uptake} = k_{on}Rt \times F$ となるべきである。従って、ウェルステアードモデル (Well-stirred model) に従えば下記ようになる。

$$CL_{uptakeLi} = \frac{Q_H \times CL_{int, uptake}}{(Q_H + CL_{int, uptake})}$$

ただし、 $CL_{int, uptake} = F \times (k_{on}Rt, \text{ ビトロ})$ である。

これについて $(Gal)_3-IL-2$ 、 $(Gal)NAc)_3-IL-2$ それぞれの連立方程式を解くことにより Q_H 及び F 値を算出した。

また、 $IL-2$ 依存性の $CTL-2$ 細胞を用いたインビトロの生物活性測定において修飾による生物活性の低下が見られなかったことから、リガンド- $IL-2$ 及び $IL-2$ の $IL-2R$ に対する解離定数は全て同じ値 ($K_d = 10 \text{ pM}$; 高親和性) に設定した。

実施例 17 リガンドのスクリーニング (1)

各リガンドを放射標識することなく k_{int} 、 k_{off} を算出せずに内在化回避能の高いリガンドをスクリーニングする方法は、以下のようにして行なった。リガンドとしては、他の実施例においてその内在化回避能が1よりも高いことが既に明らかとなっている $(Gal)_3$ を基準として、他の実施例においてアシアロ糖タンパク質レセプターに対する結合解離定数が 10 mM よりも低いという結合親和性条件を満たす新規リガンド2種 ($(Gal)_3(6)$ 、 $(Gal)_2(9)$) を比

較検討した。

具体的には実施例に示す B e r r y 等のコラゲナーゼ還流法により単離し、12wellプレート上で一晚培養したマウス初代培養肝細胞を、D-PBS、0.1% BSA及び20mM H e p e s を含む D-MEM (pH 7.4) (各2mL) で2回ずつ洗浄後、該D-MEM培地(1mL)を加え、37℃で60分、ブレインキュベートした。細胞に冷却した10mMのEDTAを含むD-PBS (pH 5.0) を添加し、氷冷下4分間放置後、冷却したD-PBS (2mL) で2回洗浄した。氷浴上にプレートのをせ、各well中の細胞に該D-MEM培地中、そのKd値の100~2000倍にあたる濃度の各リガンドを0.4mL添加し(n=3)、37℃で10分間インキュベートした。10分後、氷浴上にプレートのをせ、冷却した10mMのEDTAを含むD-PBS (pH 5.0) を添加して氷冷下4分間放置後、冷却したD-PBS (1mL) で4回洗浄した。氷浴上のまま各well中の細胞に0.6 nM の¹²⁵I-ASORの該D-MEM溶液0.4mLを加え、4℃で、60分放置した。氷浴上、冷却したD-PBS (1mL) で4回洗浄、-80℃で30分以上放置後、0.1N 水酸化ナトリウム(0.5mL)を加え、37℃で1時間以上インキュベートし、細胞溶解液をγカウンターにて測定することにより、エンドサイトーシスにより内在化した以外の表面残存レセプター(リガンド結合又はフリー)量(3回の平均値)を算出した。

この結果を次の表6に示す。

表 6

各リガンドのスクリーニング実験における ^{125}I -ASORの
マウス肝細胞への結合カウント

| Ligand | Bound (cpm) |
|------------------------|----------------|
| — | 2867 |
| (Gal) ₃ | 1784 |
| (Gal) ₂ (9) | 1670 |
| (Gal) ₃ (6) | 2015 |

この結果、いずれのリガンドについてもしリガンド無添加の系に比べASORの結合量が低く、レセプターの内在化が示された。その中で、(Gal)₃(6)は基準となる(Gal)₃に比べカウントが高く、その内在化回避能が(Gal)₃より高いリガンドである可能性が示唆された。

実施例 18 リガンドのスクリーニング (2)

各リガンドを放射標識せずに k_{on} 、 k_{off} を求め内在化回避能($=k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$)を簡便に算出し、内在化回避能の高いリガンドをスクリーニングする方法は、以下のようにして行なった。リガンドとしては、他の実施例においてその内在化回避能が1よりも高いことが既に明らかとなっている(Gal)₃を基準として、他の実施例においてアシアロ糖タンパク質レセプターに対する結合解離定数が10 mMよりも低いという結合親和性条件を満たす新規リガンド((Gal)₃(6)、(Gal)₂(9))、及び(GalNAc)₃の計3種を比較検討した。

具体的には実施例に示すBerry等のコラゲナーゼ還流法により単離し、12wellプレート上で一晚培養したマウス初代培養肝細胞を、D-PBS、0.1% BSA及び20 mM HEPESを含むD-MEM (pH 7.4) (各2 ml

L) で2回ずつ洗浄後、該D-MEM培地(1 mL)を加え、37℃で60分、ブレインキュベートした。細胞に冷却した10 mMのEDTAを含むD-PBS (pH 5.0) を添加し、氷冷下4分間放置後、冷却したD-PBS (2 mL) で2回洗浄した。このようにして準備したプレートを用い、 k_{on} 及び k_{off} 算出のための実験をそれぞれ行なった。

まず、 k_{on} については準備した該プレートを氷浴上にのせ、各wellに該D-MEM培地中、そのKd値の100~2000倍にあたる濃度のリガンドをそれぞれ0.4 mL添加し(n=3)、37℃で10分間インキュベートした。別途、リガンド無添加の系については0分及び10分間37℃でインキュベートした。時間経過後すぐにプレートを氷浴にのせ、冷却した10 mMのEDTAを含むD-PBS (pH 5.0) を添加して氷冷下4分間放置後、冷却したD-PBS (1 mL) で4回洗浄した。氷浴上のまま各well中の細胞に0.6 nMの 125 I-ASORの該D-MEM溶液0.4 mLを加え、4℃で、60分放置した。氷浴上、冷却したD-PBS (1 mL) で4回洗浄、-80℃で30分以上放置後、0.1 N水酸化ナトリウム(0.5 mL)を加え、37℃で1時間以上インキュベートし、細胞溶解液をγカウンターにて測定し、エンドサイトーシスにより内在化した以外の表面残存レセプター(リガンド結合 or フリー)量を算出した。得られたラジオアクティビティー量は全て添加液濃度(cpm/ μ L)で割ることにより、分布容積(μ L/well)に換算した。

リガンド無添加の系における37℃で0分インキュベートにおける分布容積を100として各リガンドの10分間インキュベート後の分布容積をそれぞれコントロールに対する%(% of control)に換算し、10分まで表面レセプター量が一相性に低下していると仮定して次式より各 k_{on} を算出した。

$$\% \text{ of control} = 100 * \exp(-k_{on} * 10)$$

一方、 k_{off} については準備した該プレートを氷浴上にのせ、各wellに該D-MEM培地中、そのKd値の50~2000倍にあたる濃度のリガンドをそれぞれ0.4 mL添加し(n=3)、4℃で60分間インキュベートした。別途、リガンド無添加の系については該D-MEM培地のみを0.4 mL添加してインキュベートした。時間経過後すぐにプレートを氷浴にのせ、冷却したD-PBS

(1 mL) で4回洗浄後、氷浴上のまま 各 well 中の細胞に 0.6 nM の ^{125}I -ASOR の該 D-MEM 溶液 0.4 mL を加え、4℃で、5分及び20分放置した。時間経過後すぐにプレートを生氷浴にのせ、冷却した D-PBS (1 mL) で4回洗浄後、-80℃で30分以上放置後、0.1 N 水酸化ナトリウム (0.5 mL) を加え、37℃で1時間以上インキュベートし、細胞溶解液を γ カウンターにて測定することにより、レセプターへ一度結合したコールドリガンドの解離量を算出した。得られたラジオアクティビティー量は全て添加液濃度 (cpm/ μL) で割ることにより、分布容積 ($\mu\text{L}/\text{well}$) に換算した。

リガンド無添加及びリガンド添加系についてそれぞれの20分インキュベートにおける分布容積から5分インキュベートの分布容積を差し引いて、15分間におけるそれぞれの結合速度を算出する。リガンド無添加での結合速度を100として各リガンドの結合量をそれぞれコントロールに対する% (% of control) に換算する。各% of control の値をそれぞれ100から差し引き、 $100 - (\% \text{ of control})$ の値を算出し、15分間、結合リガンド量が一相性に低下し、かつ ^{125}I -ASOR が一相性に結合していると仮定して次式より各 k_{off} を算出した。

$$k_{off} = -\ln((100 - \% \text{ of control}) / 100) / 15$$

この結果を次の表7に示す。

表 7

各リガンドのスクリーニング実験より得られた肝細胞への
取り込みに関する速度定数

| Ligand | k _{int} (min ⁻¹) | k _{off} (min ⁻¹) | k _{off} /k _{int} |
|------------------------|--|--|------------------------------------|
| (Gal) ₃ | 0.054 | 0.0566 | 1.048 |
| (GalNAc) ₃ | 0.0301 | 0.0132 | 0.439 |
| (Gal) ₂ (9) | 0.0605 | 0.0237 | 0.392 |
| (Gal) ₃ (6) | 0.0417 | 0.0677 | 1.624 |

これらの結果、得られた各リガンドのk_{int}、k_{off}、及びそれらをもとに計算したk_{off}/k_{int}の値を表に示す。この結果、基準となる(Gal)₃のk_{off}/k_{int}が約1であったのに対し、(Gal)₃(6)についてのみk_{off}/k_{int}の値がそれを上回る1.6であった。よって、(Gal)₃(6)は(Gal)₃よりもアシアロ糖蛋白質レセプターを介した肝細胞内への内在化回避能が高いことが示された。他のリガンドについてはいずれもk_{off}/k_{int}の値が1以下であり、その内在化回避能が低いことが示された。

実施例 19 修飾体の肝滞留性比較

マウス(C57BL/6, CRJ社, 6W, ♂)に(Gal)₃-IFN α 、(Gal)₃(6)-IFN α 、(Gal)₂(9)-IFN α を19.9 μ g (IFN α 換算)/kgで静脈内投与し、一定時間後(60分、90分、120分、ただし(Gal)₃-IFN α については60分、120分の2点のみ)採血及び肝臓の採取を行なった。血漿は常法により採取し、検体濃度をHuman IFN α ELISA kit (ENDOGEN社製)で測定した。肝臓は0.1%BSA含有D-PBSバッファー9倍量を添加しホモジナイズし、300

0 r p m で 1 0 分間遠心分離した後、上清を E L I S A 用バッファー (0 . 9 4 % M E M (Minimum Essential Medium) 、 0 . 2 2 5 % N a H C O ₃ 、 5 % F B S (Fetal Bovine Alubumin) 、 p H 7 . 2) で希釈し、E L I S A K i t にて肝臓中の I F N α 濃度を測定した。

この結果を次の表 8 に示す。

表 8

リガンド修飾 I F N α の肝臓中及び血漿中消失半減期

| Ligand | Liver $t_{\text{half}}(\beta)$ (min) | Plasma $t_{\text{half}}(\beta)$ (min) |
|-------------------------------------|---|--|
| (Gal) ₃ -IFN α | 31 | 45 |
| (Gal) ₃ (6)-IFN α | 58 | 89 |
| (Gal) ₂ (9)-IFN α | 28 | 35 |

その結果、各検体濃度は Log プロットにおいて直線的に低下することから、得られた各検体の肝臓中及び血漿中濃度推移について、山岡らの Line F i t t i n g プログラムである M u l t i R u n g e (Yamaoka et. al., J. Phar macobiodyn. 6(8), 595-606) を用いて解析し、 β 相の消失半減期を比較した。

その結果、肝臓中における滞留性が最も高いのは (G a l)₃(6) - I F N α であり、その半減期は (G a l)₃ - I F N α 及び (G a l)₂(9) - I F N α の約 2 倍の 58 分であった。一方、血漿中における滞留性が最も高いのも (G a l)₃(6) - I F N α であり、半減期は (G a l)₃ - I F N α 及び (G a l)₂(9) - I F N α の約 2 倍の 89 分であった。よって、スクリーニング実験により肝細胞内在化回避能が最も高かった (G a l)₃(6) リガンドを I F N α へ付与することにより、その内在化回避能が高いために (G a l)₃ リ

ガンドよりも肝滞留性を高めることが可能であることが証明された。

産業上の利用可能性

本発明は、持続時間が長いターゲティング型DDS製剤の簡便なスクリーニング方法を提供するものである。

本発明のスクリーニング方法で得られたリガンドは、生理活性作用を有する薬物と組み合わせて使用されることにより、薬物の標的細胞又は臓器中への集積効率を高め、しかも持続的な効果を発揮させることが可能なターゲティング型DDS製剤を構築することができる。即ち、生理活性蛋白質などの薬物を集中的に標的組織に集積させることができるのみならず、標的組織に集積した薬物が長時間に亘って滞留し、投与した薬物の多数を治療目的に使用することができる。投与した薬物の多くが生体内において代謝、分解されるために、従来大量に投与しなければならなかった薬物も、本発明のリガンドを使用することにより治療効果に必要な少量を投与すればよくなり、薬物による副作用も少なくすることができる。

また、薬物としては、必ずしも細胞外へ運搬させたい物に限らず、細胞内へ取り込ませたい薬物であってもよく、その場合には薬物としての毒性が高い為、他の臓器にはできるだけ分布させたくないもの、さらに、標的レセプター周辺へ集積後、できるだけ正常細胞よりも異常をきたした細胞へ取り込まれやすいものも選択することができ、副作用の少ない投与形態とすることができる。

請 求 の 範 囲

1. 標的組織に対するターゲティング型DDS製剤をスクリーニングする方法において、標的組織の細胞膜上に存在する特定のレセプターあるいは抗原等の蛋白質に対する結合親和性を有するリガンド又は当該リガンドで修飾された物質を、当該レセプターへの結合を介した内在化回避能と結合親和性の強さとを指標としてスクリーニングする方法。
2. 特定のレセプターへの結合を介した内在化回避能が、当該レセプターに対する解離速度定数 (k_{off}) と内在化速度定数 (k_{int}) との比 (k_{off}/k_{int}) であり、結合親和性の強さが解離定数 (K_d) の逆数 ($1/K_d$ 、ただし K_d は k_{off} と結合速度定数 (k_{on}) の比) である請求の範囲第1項に記載の方法。
3. レセプターに対する解離速度定数 (k_{off}) と内在化速度定数 (k_{int}) との比 (k_{off}/k_{int}) が、1以上であるリガンド又は当該リガンドで修飾された物質をスクリーニングする請求の範囲第2項に記載の方法。
4. レセプターに対する解離定数 (K_d) が10mM以下であるものをスクリーニングする請求の範囲第2項又は第3項に記載の方法。
5. レセプターに対する内在化速度定数 (k_{int}) のできるだけ小さいものをスクリーニングする請求の範囲第4項に記載の方法。
6. レセプターに対する内在化速度定数 (k_{int}) が、 0.1 min^{-1} より小さいものである請求の範囲第5項に記載の方法。
7. 標的組織の細胞膜上に存在する特定のレセプターが、アシアロ糖蛋白質レセプター (ASGP-R) である請求の範囲第1項～第6項のいずれかに記載の方法。
8. 標的組織が、肝臓である請求の範囲第1項～第7項のいずれかに記載の方法。
9. 細胞膜上に存在する特定のレセプター又は抗原等の蛋白質に対する結合親和性を有するリガンド又はリガンドで修飾された物質を、当該レセプターを発現する遊離細胞または培養細胞の存在下でインキュベートした後、細胞表面に結合しているリガンド又はリガンドで修飾された物質を洗浄した後、当該レセプターに対する標識化されたりガンドを添加して細胞内への取り込みを抑えた低温下でイ

ンキュベートし、細胞表面への標識化リガンドの結合量が、当該親和性リガンドそのものの非標識体を初期に添加した場合の結合量に比べて高くなるリガンド又はリガンドで修飾された物質をスクリーニングする請求の範囲第1項～第8項のいずれかに記載の方法。

10. 細胞膜上に存在する特定のレセプターが、肝実質細胞表面特異的に発現しているアシアロ糖蛋白質レセプター (ASGP-R) である請求の範囲第9項に記載の方法。

11. リガンドが、肝実質細胞表面特異的に発現しているアシアロ糖蛋白質レセプター (ASGP-R) に対し10 mM以下の解離定数 (K_d) となる結合親和性を有する請求の範囲第9項又は第10項に記載の方法。

12. 細胞膜上に存在する特定のレセプターに対する結合親和性を有するリガンド又はリガンドで修飾された物質を、当該レセプターを発現する遊離細胞または培養細胞の存在下でインキュベートした後、細胞表面に結合しているリガンド又はリガンドで修飾された物質をキレート剤入りのバッファー又は酸性バッファーで洗浄した後、当該レセプターに対する標識化されたりガンドを添加して細胞内への取り込みを抑えた低温下でインキュベートし、細胞表面への標識化されたりガンドの結合量が、レセプター結合後の解離速度定数と内在化速度定数の比が1以上であるリガンドを添加した場合の結合量に比べ高くなるリガンド又はリガンドで修飾された物質をスクリーニングする請求の範囲第1項～第8項のいずれかに記載の方法。

13. レセプター結合後の解離速度定数と内在化速度定数の比が1以上であるリガンドが、3分枝型ガラクトースリガンド ($(Gal)_3$) である請求の範囲第12項に記載の方法。

14. 細胞膜上に存在する特定のレセプターが、肝実質細胞表面特異的に発現しているアシアロ糖蛋白質レセプター (ASGP-R) である請求の範囲第12項又は第13項に記載の方法。

15. リガンドが、肝実質細胞表面特異的に発現しているアシアロ糖蛋白質レセプター (ASGP-R) に対し、10 mM以下の解離定数 (K_d) となる結合親和性を有する請求の範囲第12項～第14項のいずれかに記載の方法。

16. 標識化が、ラジオアイソトープラベルあるいは蛍光ラベルである請求の範囲第7項～第15項のいずれかに記載の方法。

17. リガンドが糖又はその誘導体である請求の範囲第1項～第16項のいずれかに記載の方法。

18. リガンドで修飾された物質が生理活性蛋白質である請求の範囲第1項～第13項のいずれかに記載の方法。

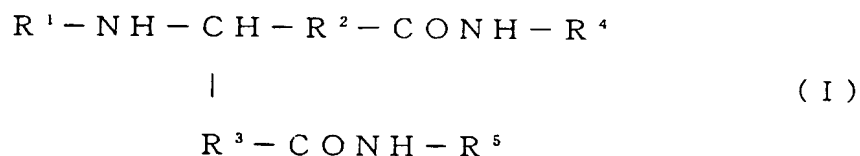
19. 生理活性蛋白質がインターロイキン2またはインターフェロン α あるいはインターフェロン β である請求の範囲第18項に記載の方法。

20. 請求の範囲第1項～第19項のいずれかに記載の方法を行うことができる装置。

21. 請求の範囲第1項～第19項のいずれかに記載の方法を行うための試薬キット。

22. 請求の範囲第1項～第19項のいずれかに記載の方法でスクリーニングされたターゲティング型DDS製剤に適したリガンド。

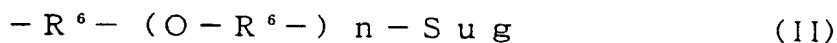
23. リガンドが、次式(I)、



[式中、 R^1 は水素原子、又は生理活性物質に結合し得る官能基を有する有機残基を示し、

R^2 、 R^3 はそれぞれ独立して単結合、又は炭素数1～5の直鎖状又は分枝状のアルキレン基を示し、

R^4 は次式(II)



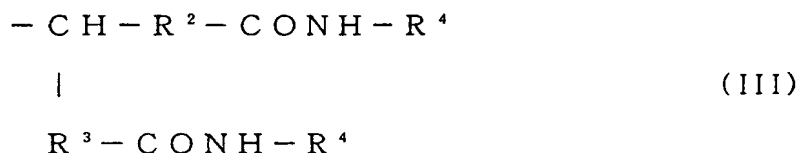
(式中、 R^6 はそれぞれ独立して炭素数2～5の直鎖状又は分枝状のアルキレン基を示し、

Sug基は糖類基を示し、

n は 1 ～ 5 の整数である。)

で表される基を示し、

R⁵ は前記 R⁴、又は次式 (III)



(式中、R²、R³、及び R⁴ はそれぞれ前記した基を示す。)

で表される基を示す。]

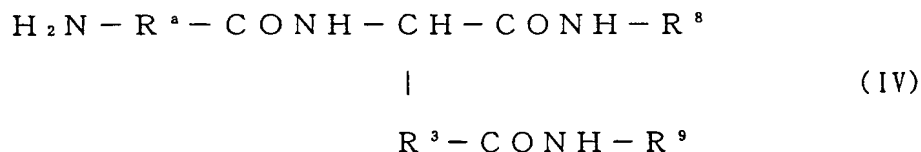
で表される化合物である請求の範囲第 22 項に記載のリガンド。

24. R¹- が、H₂N-R^a-CO- (式中、R^a は、炭素数 1 ～ 15 の直鎖状又は分枝状のアルキレン基を示す。) である請求の範囲第 23 項に記載のリガンド。

25. Sug 基における糖類基が、ガラクトースである請求の範囲第 23 項に記載のリガンド。

26. 式 (I) における R⁵ が、R⁴ である請求の範囲第 23 項～第 25 項のいずれかに記載のリガンド。

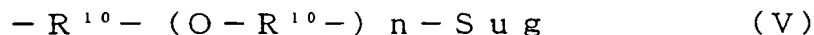
27. 次式 (IV)、



[式中、R^a は、炭素数 1 ～ 15 の直鎖状又は分枝状のアルキレン基を示し、

R³ は、炭素数 1 ～ 5 の直鎖状又は分枝状のアルキレン基を示し、

R⁸ は次式 (V)



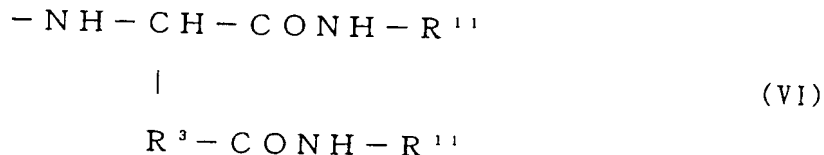
(式中、R¹⁰ はそれぞれ独立して炭素数 2 ～ 5 の直鎖状又は分枝状のアルキレン基を示し、

Sug 基は糖類基又はその誘導体を示し、

n は 1 ～ 5 の整数である。)

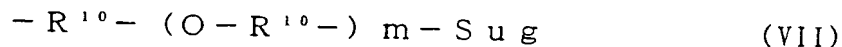
で表される基を示し、

R^9 は前記 R^8 、又は次式 (VI)



(式中、 R^3 は、炭素数 1 ～ 5 の直鎖状又は分枝状のアルキレン基を示し、

R^{11} は次式 (VII)



(式中、 R^{10} はそれぞれ独立して炭素数 2 ～ 5 の直鎖状又は分枝状のアルキレン基を示し、

Sug 基は糖類基又はその誘導体を示し、

m は 1 ～ 5 の整数である。ただし、 m は前記式 (V) における n とは異なる整数である。)

で表される基を示す。]

で表される化合物。

28. Sug 基における糖類基又はその誘導体が、ガラクトースである請求の範囲第 27 項に記載の化合物。

29. 請求の範囲第 1 項～第 19 項のいずれかに記載の方法でスクリーニングされたターゲティング型 DDS 製剤に適したリガンドを有する生理活性物質、及び製薬上許容される担体とからなる医薬組成物。

30. 生理活性物質が生理活性蛋白質である請求の範囲第 29 項に記載の医薬組成物。

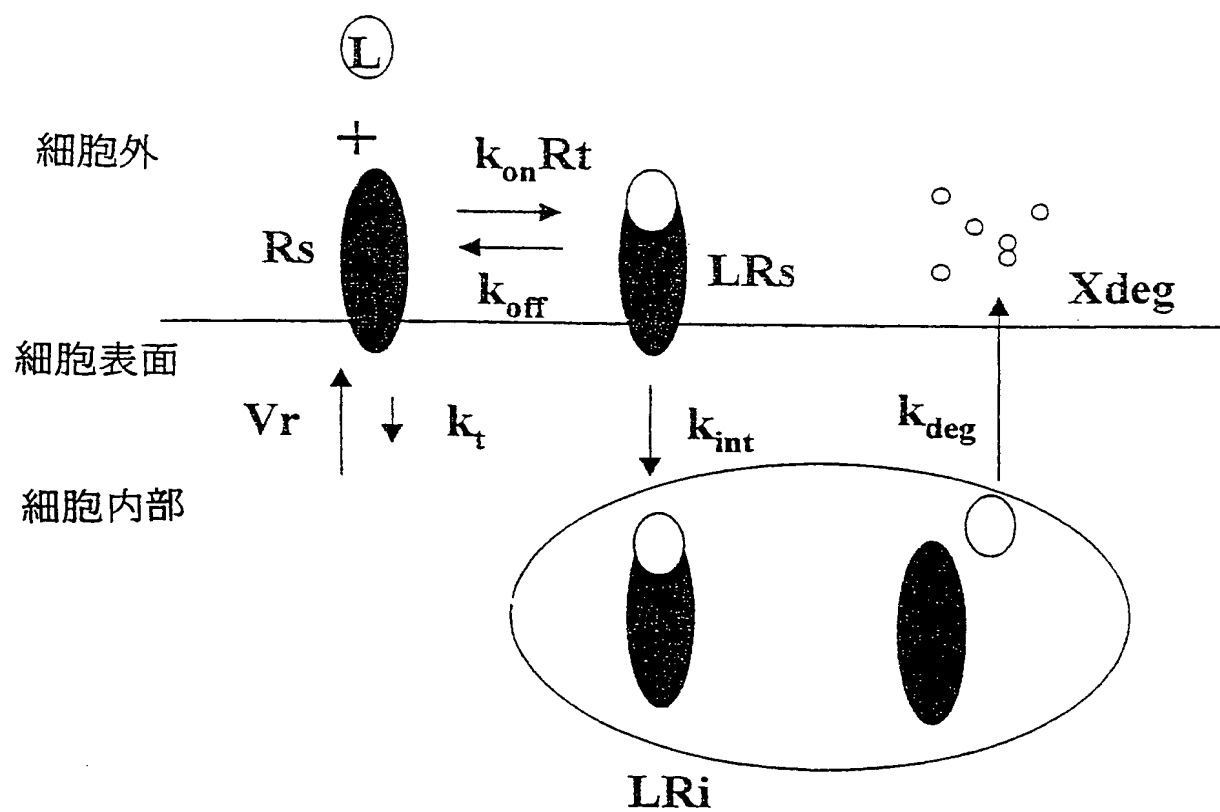
31. リガンドが、肝実質細胞表面特異的に発現しているアシアロ糖蛋白質レセプター (ASGPR) に対し結合親和性を保持したリガンドであって、その肝細胞への解離速度定数 (k_{off}) と内在化速度定数 (k_{int}) との比 (k_{off}/k_{int}) が 1 より大きいことから肝細胞外液中での滞留性を有する肝認識リガンドである請求の範囲第 29 項又は第 30 項に記載の医薬品組成物。

32. リガンドが、肝実質細胞表面特異的に発現しているアシアロ糖蛋白質レセ

ブター (ASGP-R) に対する結合親和性の強さの指標である解離定数 K_d 値が 10 mM 以下で、かつ内在化速度定数 (k_{int}) が 0.1 min^{-1} より小さく、 k_{off}/k_{int} 比が 1 より大きい速度論的性質を有する肝認識リガンドである請求の範囲第 31 項に記載の医薬品組成物。

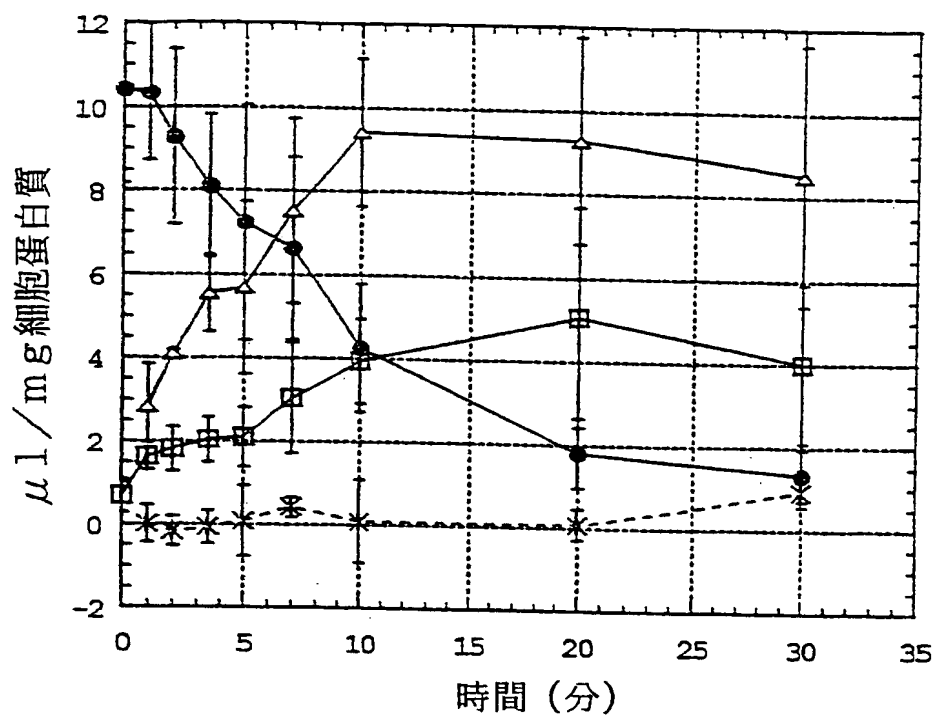
33. リガンドが、分岐したガラクトース (Gal)、N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) あるいはその誘導体である請求の範囲第 29 項～第 32 項のいずれかに記載の医薬品組成物。

第 1 図

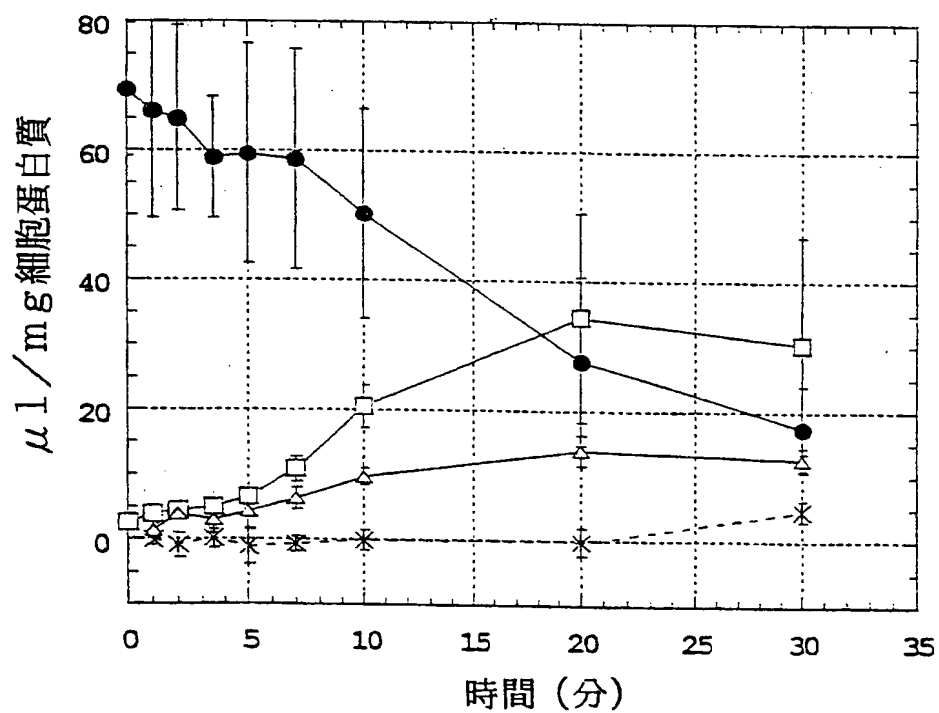




第 2 図

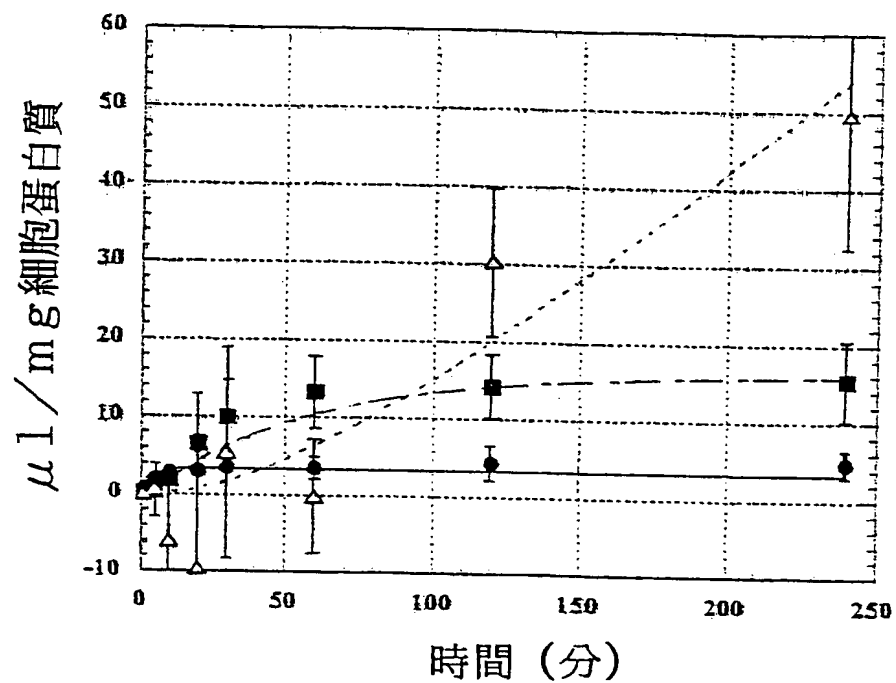


第 3 図

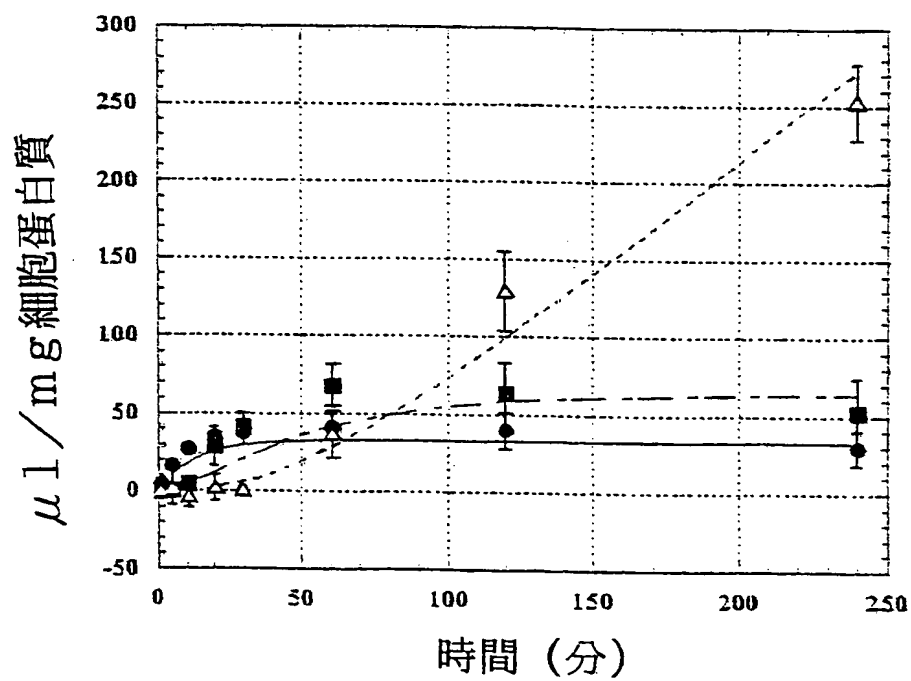




第 4 図

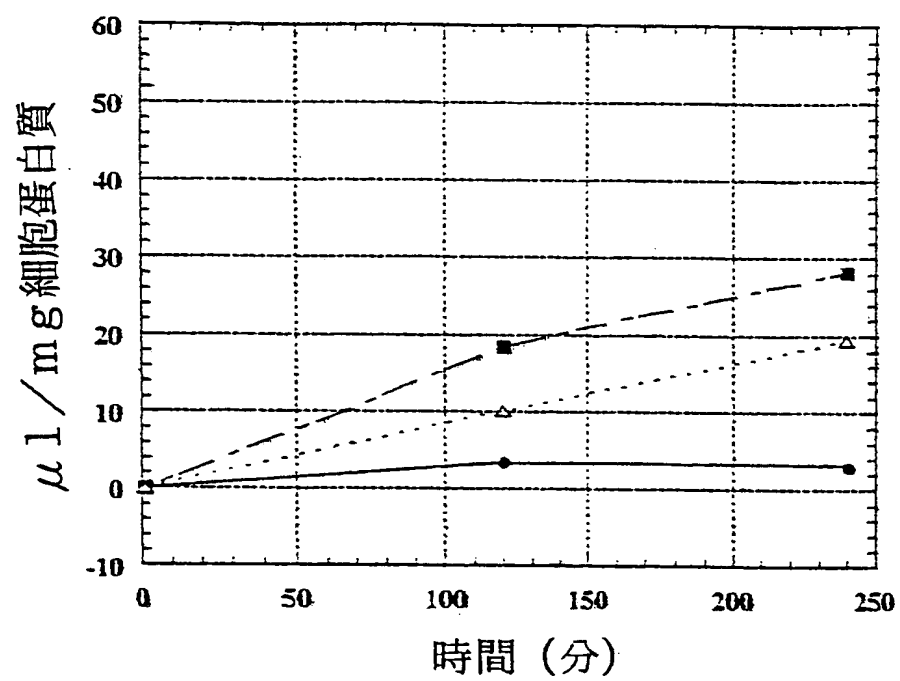


第 5 図



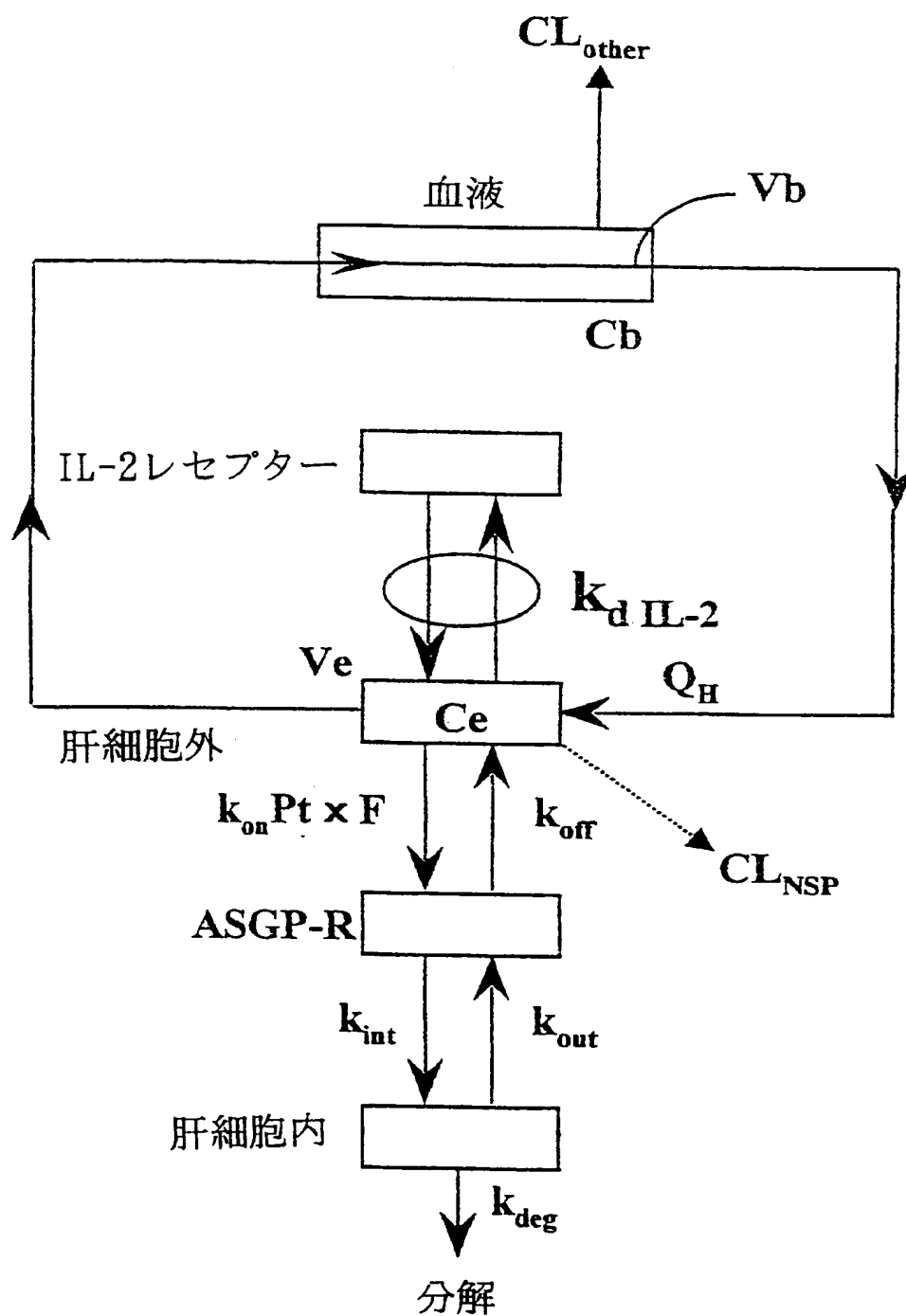


第 6 図



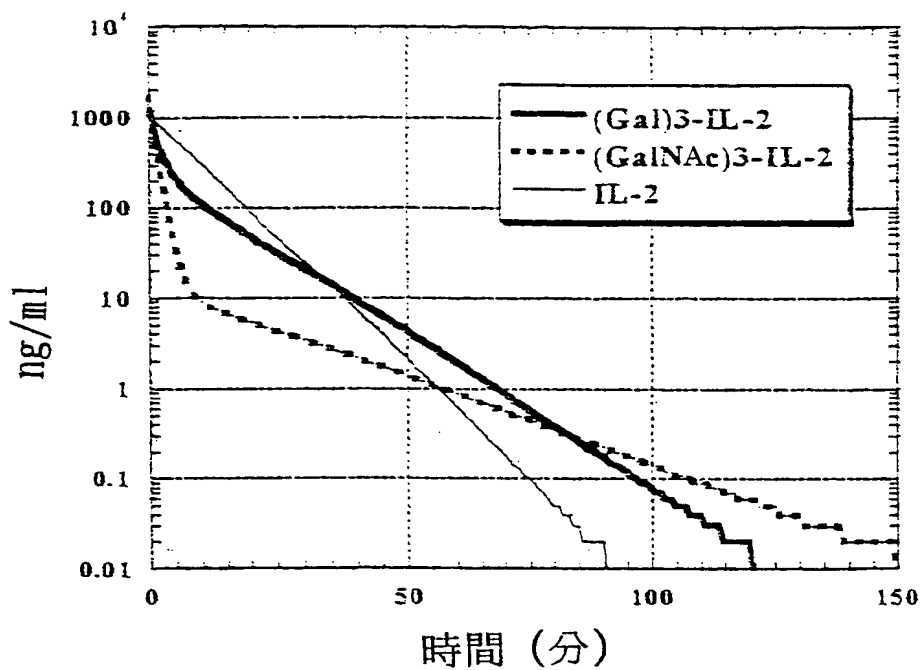


第 7 図

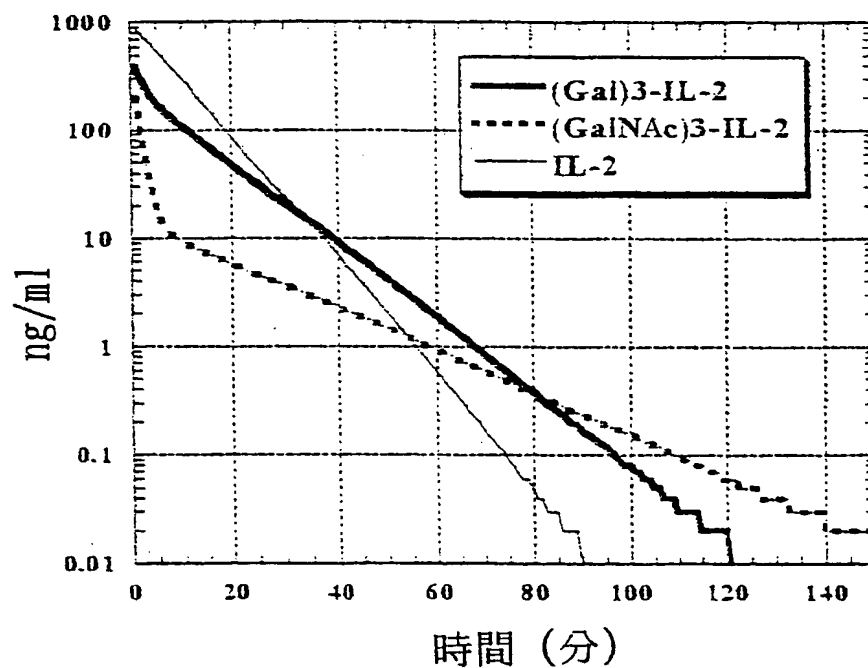




第 8 図

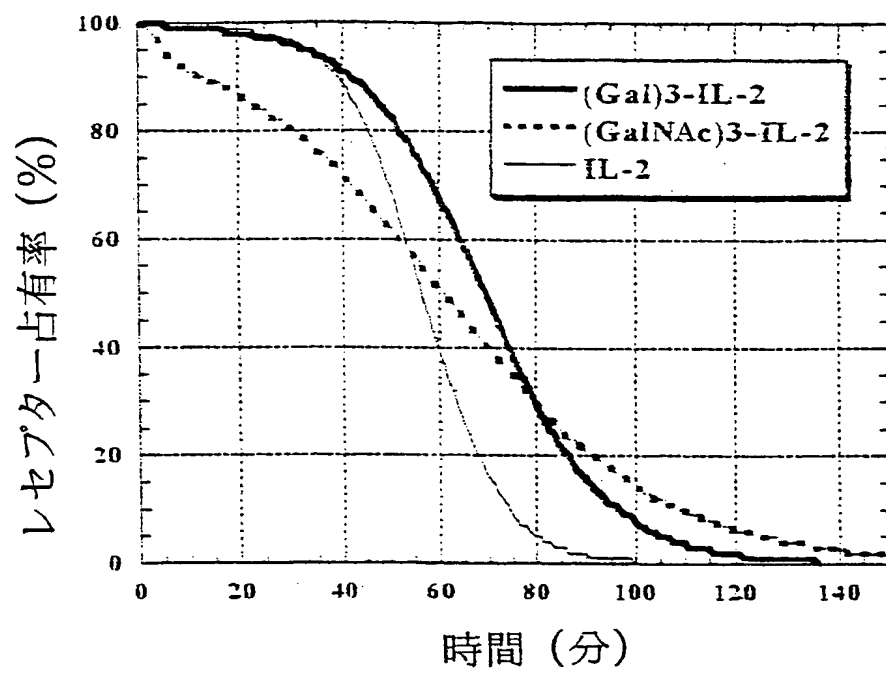


第 9 図





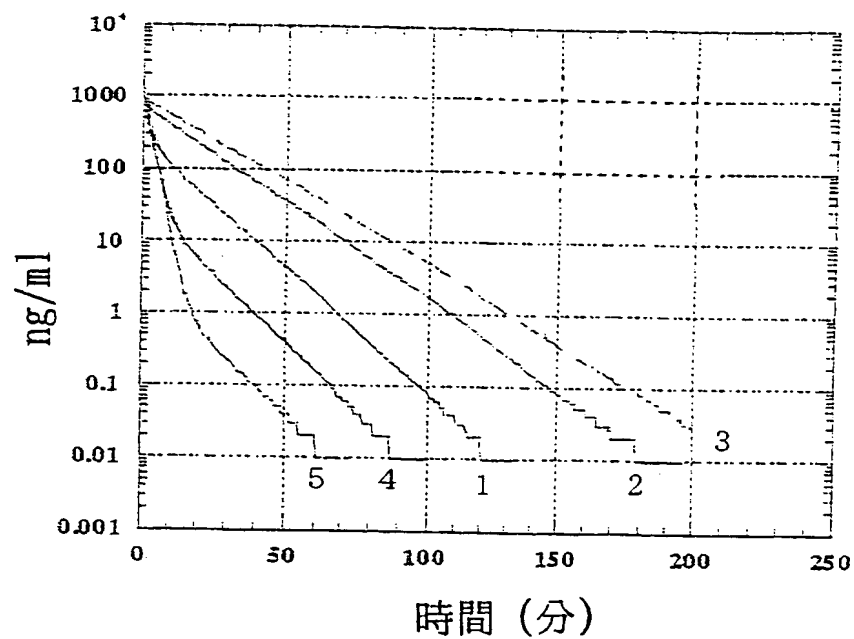
第 10 図



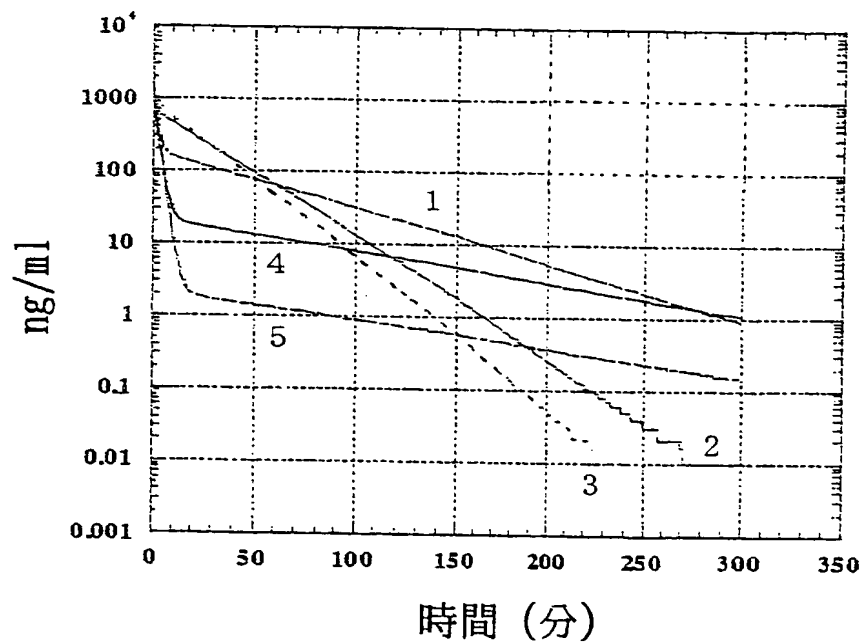


第 1 1 図

(A)

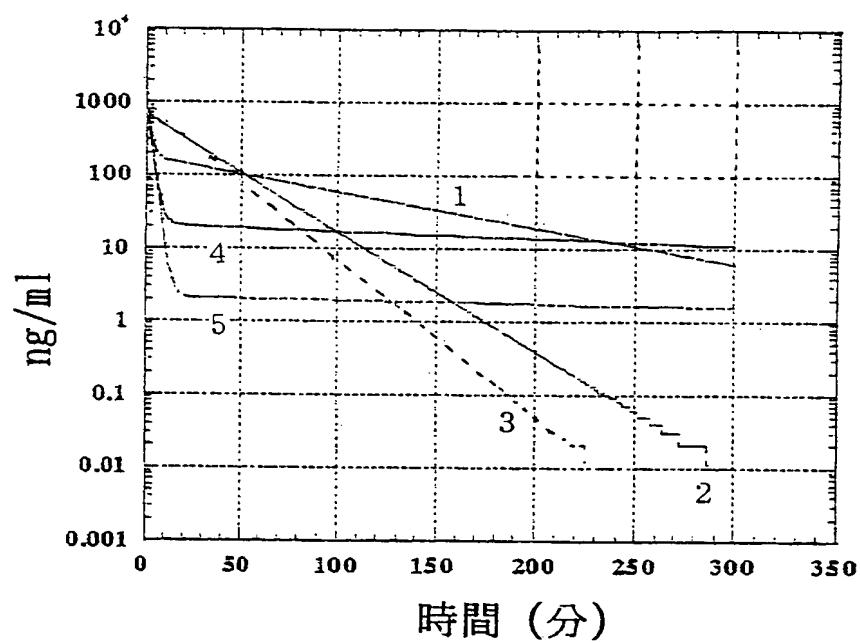


(B)





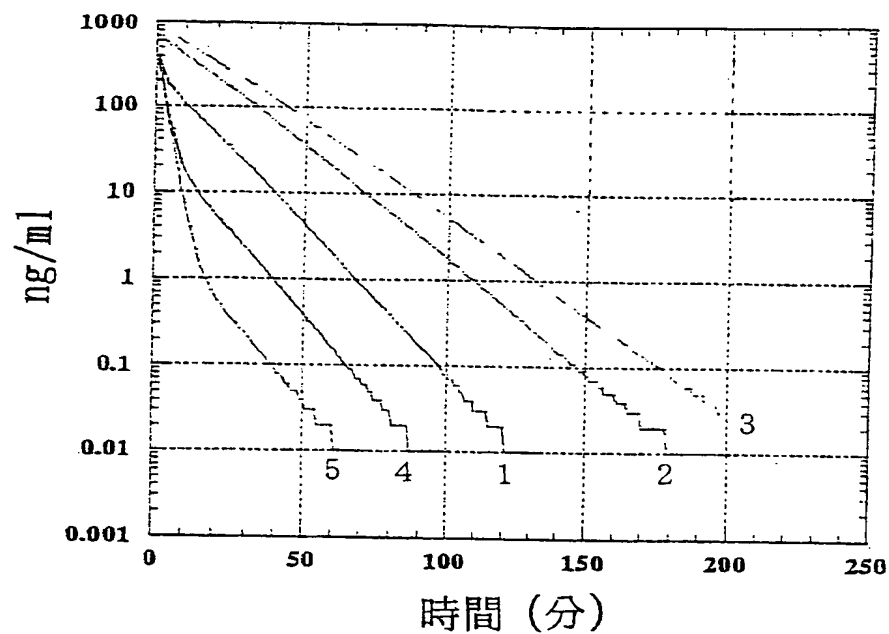
(C)



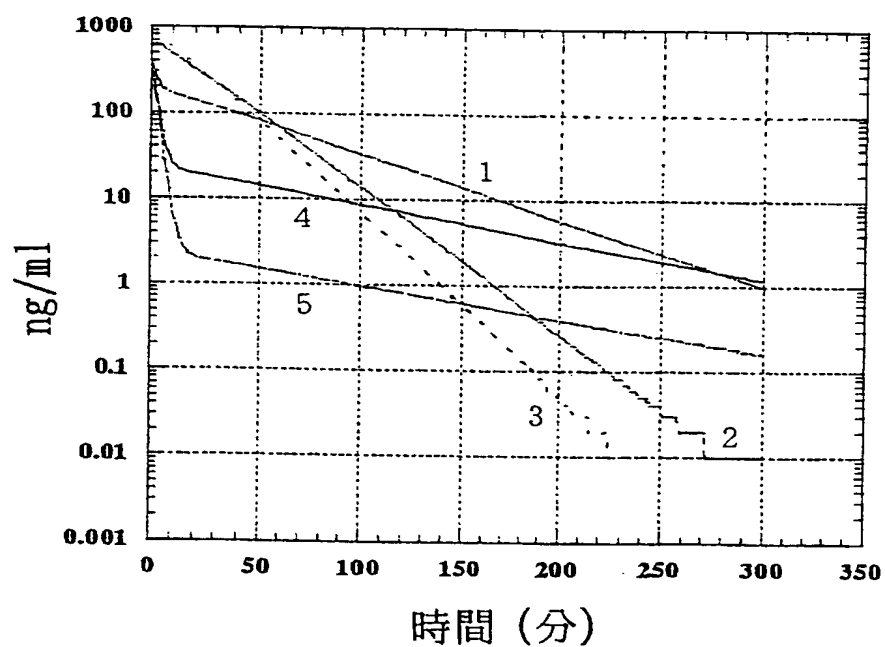


第 1 2 図

(A)

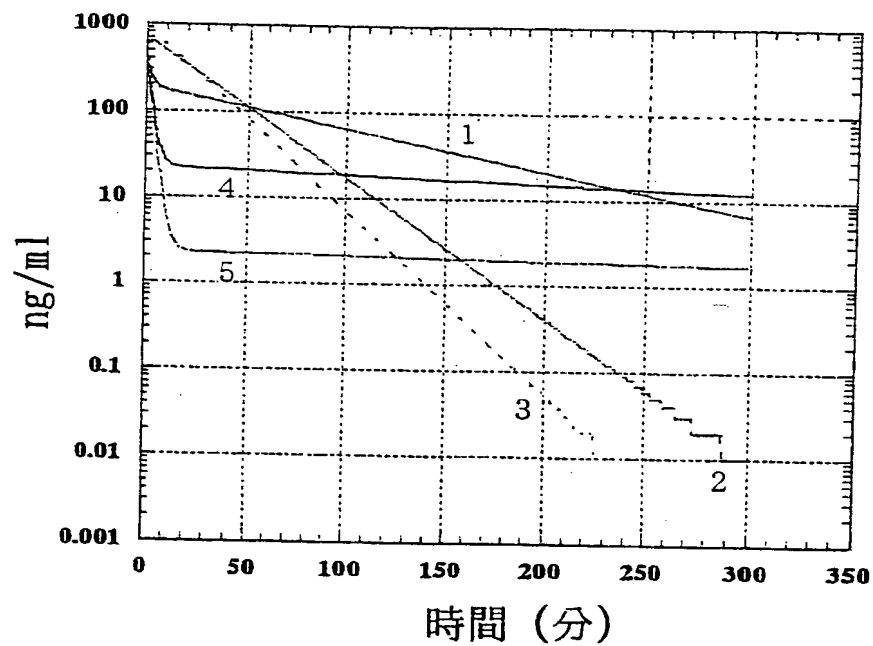


(B)





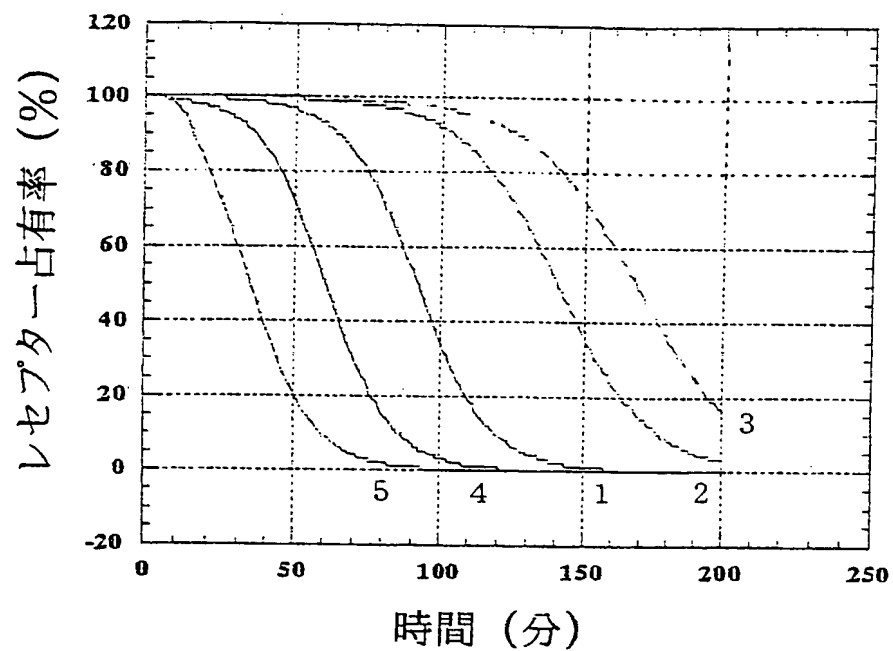
(C)



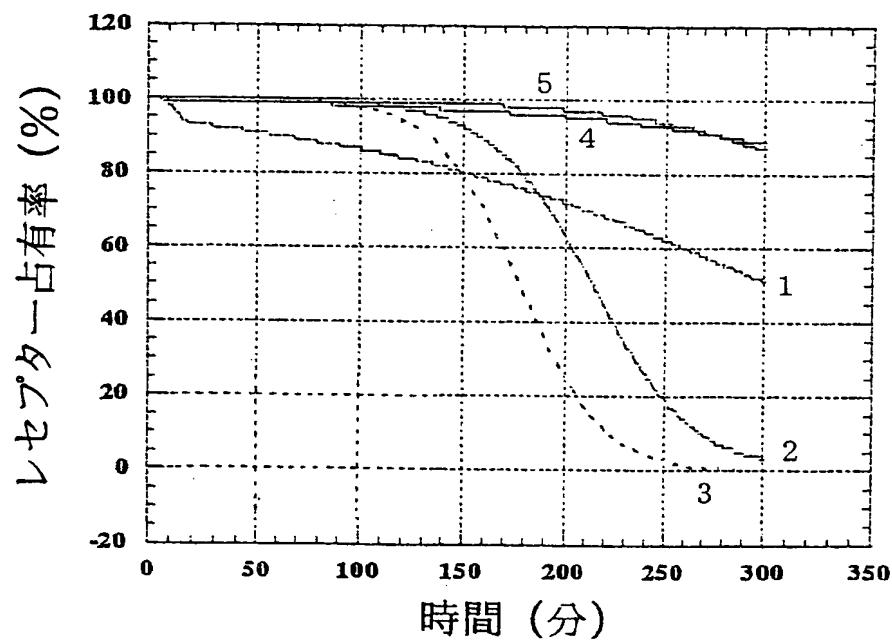


第 1 3 図

(A)

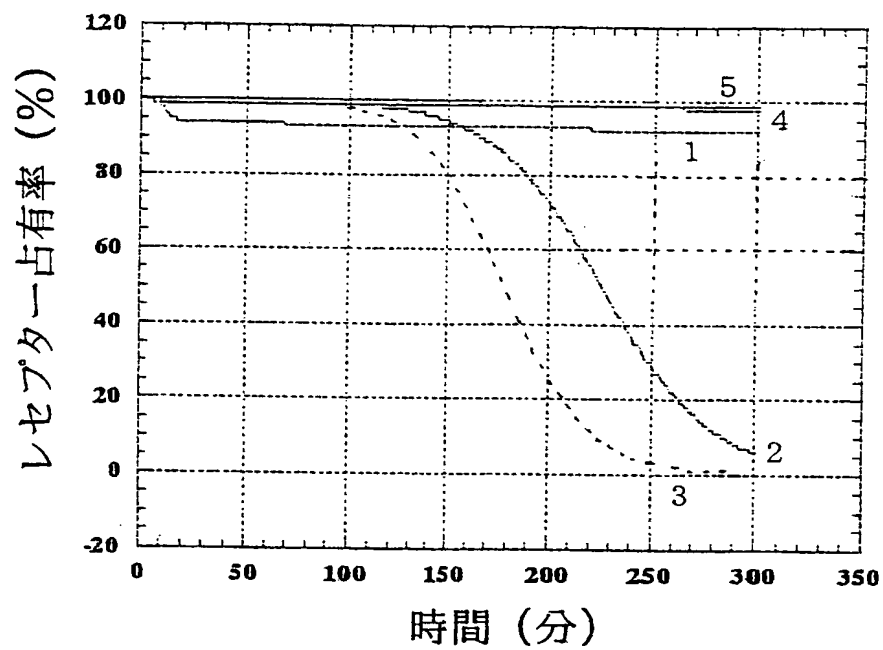


(B)



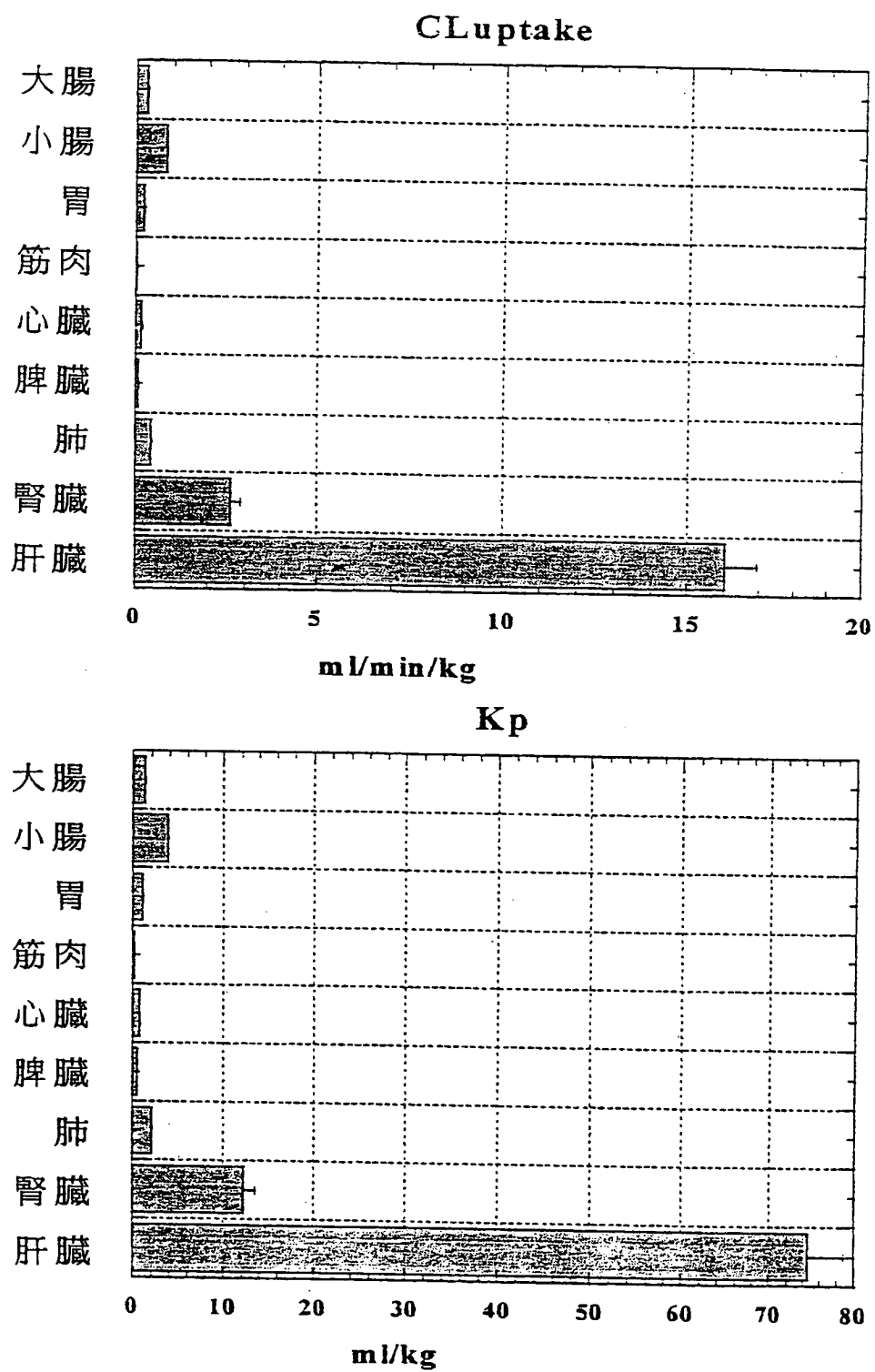


(C)



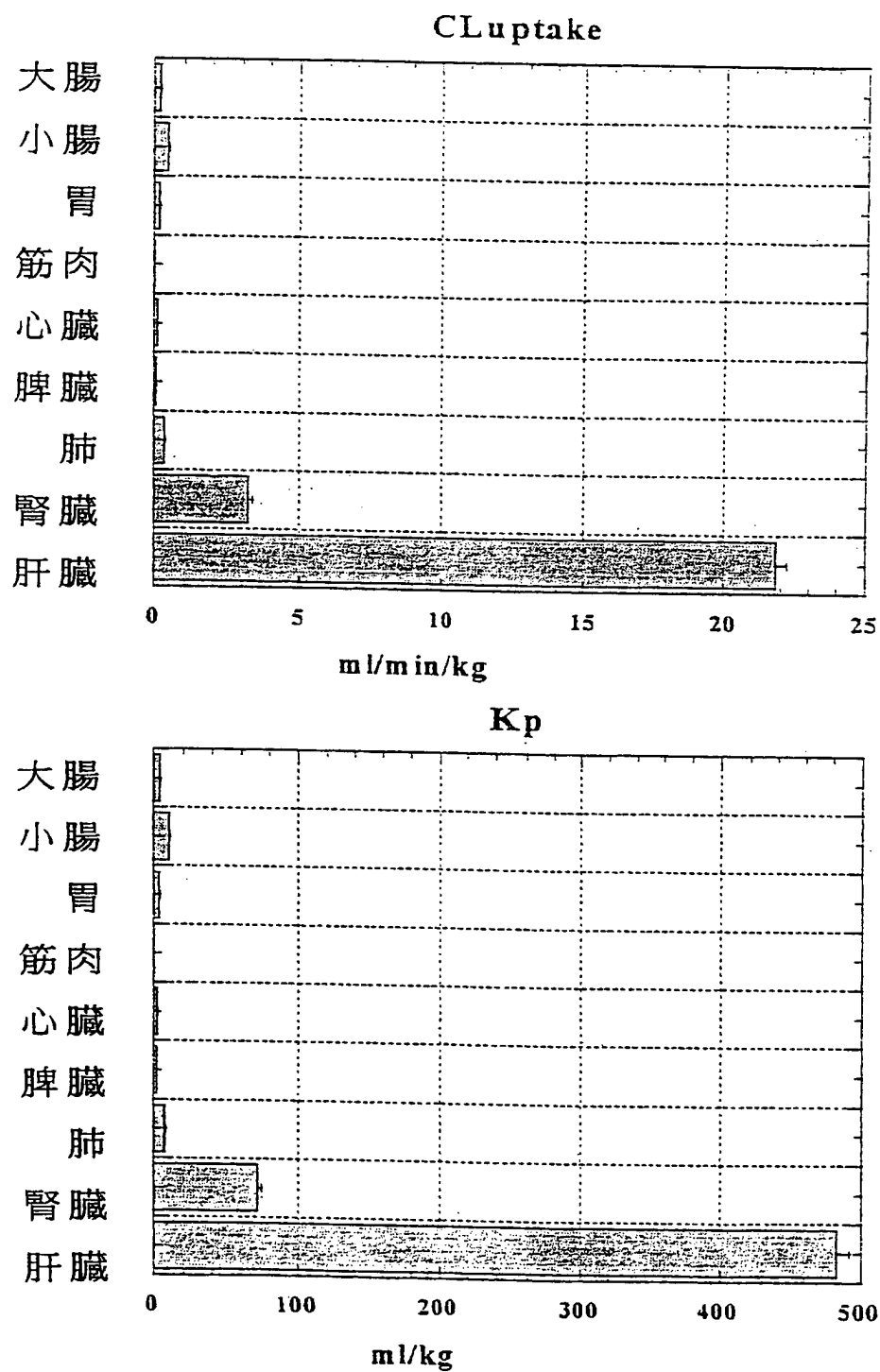


第 1 4 図





第 15 図





INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04362

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ G01N33/15, G01N33/566, G01N33/50, A61K47/48, A61K38/20, A61K38/21, A61K31/7028, C07H15/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ G01N33/15, G01N33/566, G01N33/50, A61K47/48, A61K38/20, A61K38/21, A61K31/7028, C07H15/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
 Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2000
 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2000 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2000

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
 CA (STN), REGISTRY

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| A | Matsuda, M. et al., Interaction between the amino-terminal SH3 domain of CRK and its natural target proteins. Journal of Biological Chemistry, 1996, Vol. 271, No. 24, pp.14468-14472 | 1-33 |
| A | Bider, M. et al., High-affinity ligand binding to subunit H1 of the asialoglycoprotein receptor in the absence of subunit H2. European Journal of Biochemistry, 1995, Vol.230, No.1, pp.207-212 | 1-33 |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
 16 August, 2000 (16.08.00)

Date of mailing of the international search report
 29 August, 2000 (29.08.00)

Name and mailing address of the ISA/
 Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO0/04362

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N33/15, G01N33/566, G01N33/50, A61K47/48, A61K38/20, A61K38/21, A61K31/7028, C07H15/04

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N33/15, G01N33/566, G01N33/50, A61K47/48, A61K38/20, A61K38/21, A61K31/7028, C07H15/04

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年

日本国公開実用新案公報 1971-2000年

日本国登録実用新案公報 1994-2000年

日本国実用新案登録公報 1996-2000年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), REGISTRY

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|------------------|
| A | Matsuda, M. <i>et al</i> , Interaction between the amino-terminal SH3 domain of CRK and its natural target proteins. Journal of Biological Chemistry, 1996, Vol. 271, No. 24 p14468-14472 | 1-33 |
| A | Bider, M. <i>et al</i> , High-affinity ligand binding to subunit H1 of the asialoglycoprotein receptor in the absence of subunit H2. European Journal of Biochemistry, 1995, Vol. 230, No. 1 p207-212 | 1-33 |

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16.08.00

国際調査報告の発送日

29.08.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

加々美一恵

2J

9408

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

明らかな誤りの訂正請求書

特許庁長官 殿



1. 国際出願の表示 PCT/JPO0/04362

2. 出願人 (代表者)

氏名 (名称) 味の素株式会社

AJINOMOTO CO., INC.

あて名 〒104-8315

日本国東京都中央区京橋一丁目15番1号

15-1, Kyobashi 1-chome, Chuo-ku, Tokyo

104-8315 JAPAN

国籍 日本国 JAPAN

住所 日本国 JAPAN

3. 代理人

氏 名 (10266) 弁理士 佐伯 憲生

SAEKI Norio



あて名 〒103-0027

日本国東京都中央区日本橋三丁目15番2号

高愛ビル 9階

9th floor, Taka-ai Building, 15-2,

Nihonbashi 3-chome, Chuo-ku, Tokyo 103-0027 JAPAN

4. 訂正の対象

願書Ⅲ-7欄

5. 訂正の内容

「YUGIYAMA, Yuichi」を

「SUGIYAMA, Yuichi」と訂正する。

特許協力条約

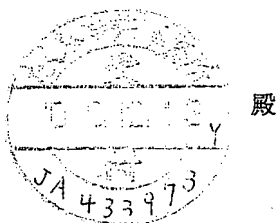
発信人 日本国特許庁（受理官庁）

出願人代理人

佐伯 憲生

あて名

〒103-0027

東京都中央区日本橋3丁目15番2号 高愛
ビル9階 たくみ特許事務所

殿

P C T

明らかな誤りの訂正請求
に関する決定の通知書

(法施行規則第77条)

[PCT規則91.1(f)]

PCT/JP00/04362

RO109

| | | |
|----------------------------------|--|------------------------------|
| 出願人又は代理人 の書類記号 JA 4 3 3 9 7 3 | | 発送日（日．月．年） 12. 12. 00 |
| 国際出願番号 PCT/JP00/04362 | | 応答期間 無し ただし、下記に記載の注意参照 |
| 出願人（氏名又は名称） 味の素株式会社 | | 国際出願日（日．月．年） 30. 06. 00 |

出願人が提出した国際出願の願書における「明らかな誤りの訂正のための請求」について検討し、次のとおり決定したことを通知する。

1. ☒ 出願人が請求した訂正については、

☒ 請求したとおり認める。

☐ 次の範囲まで認める。*

2. ☐ 次の理由により出願人が請求した訂正の全部又は一部は認められない。*

この通知書の写しは、出願人の訂正請求書とともに国際事務局に送付した。

* 訂正請求の全部又は一部が認められなかった場合に、出願人は、国際事務局に対して、国際公開の技術的な準備が完了するときまでに特別の手数料の支払いを条件として、訂正のための請求を国際出願とともに公表するように要請することができる。（PCT規則91.1(f)第3文及び第4文を参照。手数料については「PCT出願人の手引き」第I巻・附属書B2(WO)を参照）

名称及びあて名

日本国特許庁（RO/JP）

郵便番号 100-8915 TEL 03-3592-1308

日本国東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

様式PCT/RO/109（1998年7月）

権限のある職員

特許庁長官

